GE Healthcare

Biacore X100
Plus Package Ver. 2

Instrument Handbook

日本語取扱説明書

71-3333-31

目　次

実験をはじめる前に

Ⅰ. Biacore（ビアコア）とは

Biacore は、表面プラズモン共鳴（surface plasmon resonance, SPR）という光学現象を利用して生体分子間の相互作用をラベルなしでリアルタイムにモニターする装置です。
Biacore システムの研究対象は、タンパク質-タンパク質間相互作用に限定されず、脂質-タンパク質、核酸-タンパク質、核酸-核酸、細胞-タンパク質あるいは低分子化合物-タンパク質などさまざまな分子間相互作用におよびます。
使用目的は、それら分子間の特異的結合の検討（スクリーニング）、解離定数の算出、反応速度定数の算出、分子間の特異的結合を利用した濃度測定など、多岐にわたります。

Ⅱ. 実験の流れ

データを取得するまでの実験の流れは、以下の通りです。
①センサーチップへの分子の固定化
②相互作用測定のための条件検討
③相互作用測定（データ取り）
④解析
各項目について、概説します。

Ⅲ. 固定化

リガンド

相互作用を検討する分子のうち、固定化する分子をリガンドと言います。リガンドの精製度は、結合特異性の判定やアナライトの結合許容量に大きく影響します。90% 以上の精製度のリガンドを使用します。

各種固定化方法

センサーチップ CM5 に化学結合で固定化する代表的な方法を記載します。詳細およびその他の固定化方法については、“生体分子相互作用解析　攻略ガイド”を参照してください。

アミンカップリング法

リガンド表面に存在するアミノ基（N 末端アミノ基またはリジンε-アミノ基）を利用して固定化する方法です。CM（カルボキシメチル）デキストランのカルボキシル基を NHS（N-ヒドロキシスクシンイミド）で活性化し、リガンドを固定化します。固定化後、残った活性 NHS 基をエタノールアミンでブロッキングします。

リガンドチオールカップリング法

リガンドの表面に存在する遊離型チオール基を用いて-S-S-結合で固定化する方法です。

サーフェスチオールカップリング法

センサー表面にチオール基を導入し、リガンドのカルボキシル基を介して-S-S-結合で固定化する方法です。

アルデヒドカップリング法

大量の糖鎖を持つムチンタンパク質などの糖を利用して固定化をする方法です。糖鎖の非還元末端をメタ過ヨウ素酸により開裂させアルデヒド基を作成して、ヒドラジンによりヒドラジノ基を導入したセンサーチップにシッフ塩基で固定化します。

固定化量

実験の目的によって調節する必要があります。

特異的結合の有無の判定、スクリーニング

アナライトの結合レスポンスが十分得られる固定化量が必要となります。固定化量の下限として、理論的最大結合量 R_{max}（固定化したリガンドにアナライトが最大量結合したときのレスポンス）が、最低でも 100 RU は必要です（アナライトがタンパク質の場合）。理論的な最大結合量は、以下の式で算出することができます。

アナライトの最大結合レスポンス（理論的最大結合量 R_{max}）
=アナライトの分子量 x リガンドの固定化量/リガンドの分子量 x S
（Da）　　　　　　　　　（RU）　　　　　（Da）
S はリガンドのアナライト結合部位数

（例）		
	リガンドの分子量	50,000 Da
	リガンド固定化量	1,000 RU
	アナライト結合部位数	1
	アナライト分子量	20,000 Da
	理論的最大結合量	（R_{max}） = 20,000 x 1,000 / 50,000 x 1 = 400 RU

濃度測定

固定化量はできるだけ多くします。目安として、タンパク質リガンドの場合、10,000 RU 以上固定化します。固定化量を多くすると既知濃度アナライト測定時に得られる結合レスポンス RU vs C（濃度）をプロットした検量線の直線性が高くなります。

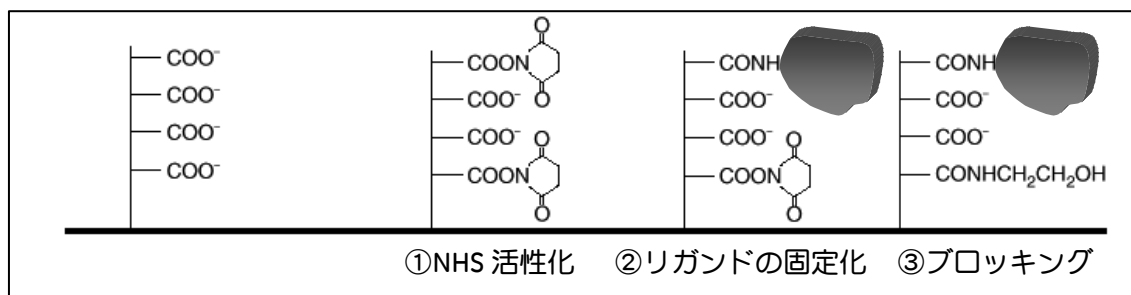
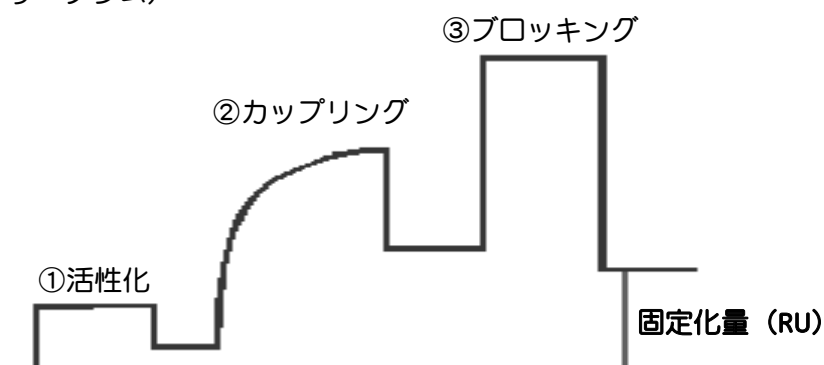
反応速度定数（k_a,k_d）、解離定数（K_D）の算出

固定化量はできるだけ抑えます。マストランスポートリミテーション（固定化量が多いことにより、アナライトの供給が追いつかない現象）を抑制するためです。至適固定化量は、以下の式から算出される最大と最小の固定化量（RU）の範囲となります。

最小固定化量（RU）
200 x 1/S x （リガンドの分子量／アナライトの分子量）
最大固定化量（RU）
1,000 x 1/S x (リガンドの分子量／アナライトの分子量）
S はリガンドのアナライト結合部位数

（例）		
	リガンドの分子量	50 kDa
	アナライトの分子量	100 kDa
	アナライト結合部位数	1
	最小固定化量	200 x 1/1 x（50,000/100,000） ＝ 100 RU
	最大固定化量	1,000 x 1/1 x（50,000/100,000） ＝ 500 RU
	至適固定化量範囲	100～500RU

Ⅲ-ｉ．アミンカップリング法

リガンド表面に存在するアミノ基（N 末端アミノ基またはリジンε-アミノ基）を利用して固定化します。CM デキストランのカルボキシル基を NHS（N-ヒドロキシスクシンイミド）で活性化し、至適な緩衝液で希釈したリガンドを固定化します。残った活性 NHS 基をエタノールアミンでブロッキングします。

準備するもの

アミンカップリングキット（BR-1000-50）

アミンカップリングキットには、以下の試薬が含まれています。

EDC (N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride)

NHS (N-hydroxysuccinimide)

1 M ethanolamine hydrochloride 溶液 (pH 8.5)

キットに添付されている説明書にしたがい、EDC および NHS はそれぞれ 10 ml の超純水に溶解します。直ちに 200 µl ずつを 11 mm プラスチックバイアルにそれぞれ分注し、ラバーキャップをして使用直前まで-20℃ で冷凍保存します。使用直前に 1 組ずつの試薬を取り出して、融解させて使用します。融解後、試薬の再凍結はできません。エタノールアミンは、溶液で供給されるので冷蔵（4℃）保存します。200 µl ずつ小分けしておくか、使用する直前に分注します。

ランニング緩衝液

1 級アミンを含まない緩衝液。

（トリスやグリシン緩衝液は避けます）

リガンド

アジ化ナトリウムなどの求核性物質を含まないもの。

（リガンドの安定化目的のために混入されている BSA（ウシ血清アルブミン）などのタンパク質類はあらかじめ除去します）

リガンド希釈液

10 mM 酢酸緩衝液もしくは、10 mM Borate/1 M NaCl 緩衝液（pH 8.5）

リガンドの調製

リガンドがタンパク質の場合

濃度は 5～200 μg/ml 程度になるよう 10 mM 酢酸緩衝液で希釈します。酢酸緩衝液の pH はリガンドの等電点より 0.5～2 低い pH を使用します。希釈用緩衝液として pH 3.5 以下のものは使用しないでください。

等電点が不明な場合は、固定化前に、至適な 10 mM 酢酸緩衝液の pH を検討します。

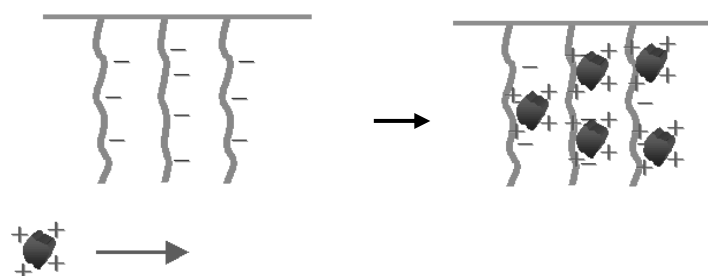
濃縮効果が確認できない酸性タンパク質の場合は、サーフェスチオールカップリングもしくはリガンドをビオチン化後、センサーチップ SA に固定化する方法を検討します。

リガンドがペプチドや低分子物質の場合

100 μg/ml 以上の高濃度のリガンドを使用し、弱アルカリ性条件 10 mM Borate/1 M NaCl 緩衝液（pH 8.5）で希釈します。活性型 NHS 基とアミノ基との反応効率は、pH 8.5 前後が最も高いです。

溶解性が低い低分子化合物を固定化する際には、DMSO などの有機溶媒存在下で固定化を実施します。有機溶媒を利用する際には、化学耐性を英語版マニュアル（Instrument handbook）で確認します。

Ⅲ-ⅱ．リガンド希釈液の pH 選択

センサーチップ CM5 表面にコーティングされている直鎖デキストランにはカルボキシル基が導入されているため、表面は負に荷電しています。リガンドを正に荷電した状態で添加すると、負に荷電している CM デキストランとの間に静電気的な結合が生じ、リガンドを CM デキストラン中に濃縮することができます（この濃縮効果を、プレコンセントレーション効果とも言います）。濃縮効果が得られる条件を用いることで、低濃度のリガンドをセンサーチップ表面に高濃度で供給でき、効率よく固定化できます。

等電点が既知のリガンドの場合
等電点よりも 0.5 以上低い pH を使用します。ただし、等電点が既知の場合であっても、高次構造の状態などにより、濃縮される pH が予想外に異なることもあるため、固定化前に、ウィザードの Immobilization pH Scouting により確認することをおすすめします。

等電点が不明な場合
ウィザードの Immobilization pH Scouting を実行し、希釈液の pH を検討します。この操作は、何も処理していないフローセル（固定化実施予定のセル）を使用して、各 pH におけるセンサー表面へのリガンドの濃縮度合いを評価します。この検討で、リガンドは固定化されません。検討後、引き続き、そのセルに固定化を行います。
リガンドは終濃度 5～200 µg/ml 程度になるよう 10 mM 酢酸緩衝液で希釈します。
Immobilization pH Scouting では、リガンド添加終了後、ランニング緩衝液に置換されると、通常は静電的に結合したリガンドはセンサーチップ表面から速やかに解離します。しかし、まれに、リガンドがデキストランに非特異的吸着を起こすため、リガンド添加終了後、洗浄溶液（50 mM NaOH）を添加し、吸着したリガンドの洗浄を行う操作が組み込まれています。

Ⅳ．相互作用測定

Ⅳ-ｉ．相互作用測定のための条件検討

リガンドの固定化が完了した後、アナライトの特異的結合の確認を行います。引き続き、再生条件の検討を行います。再生条件が決まったら、同一濃度のアナライトを添加し、再現性の確認を行います。

アナライト

リガンドを固定化したセンサーチップに対して、リガンドとの結合を測定する目的で添加する分子です。血清や培養上清などのクルード（crude）なサンプルを使用できますが、不溶性の粒子などは遠心などで除去します。反応速度定数や解離定数算出を目的とした実験の場合は、精製したモル濃度が既知のアナライトが必要となります。

アナライトの調製

ランニング緩衝液で希釈します。希釈できない場合は、ランニング緩衝液でゲルろ過などを使用し緩衝液交換するか、ランニング緩衝液自体をアナライト溶解液条件に合せることが必要となる場合があります。緩衝液が異なる場合には、溶液効果（Bulk Effect：ランニング緩衝液と添加溶液の密度の差により発生するレスポンスの差）が発生します。反応速度定数や解離定数の算出を目的とした実験においては、結合領域（アナライト溶解液）と解離領域（ランニング緩衝液）が異なる緩衝液組成条件下の測定になり、解析結果に影響を与えます。

アナライト濃度は結合の強さや分子量にもよりますが、数十 ng/ml～数百 μg/ml で行います。反応速度定数を算出する場合には、予想される K_D（解離定数）値濃度の 1/10～10 倍の濃度で解析すると良好な結果が得られます。予備検討時は、結合が弱いことや再生条件（リガンドに結合したアナライトを溶出し、リガンド固定化表面を固定化直後の状態に再生する操作）を検討する必要性を考慮し、高濃度アナライト（タンパク質アナライトの場合、数～数十 μg/ml）を用いるのが望ましいです。

リファレンスセル

溶液効果および非特異的吸着を差し引くために、必ずリファレンスセルへもアナライトを添加します。リファレンスセルは、未処理のセル、活性化・ブロッキングセル、ネガティブコントロールリガンド固定化セルなどを利用します。

再生溶液

リガンドに結合したアナライトを強制的に解離させる操作を再生といいます。解離が速い相互作用では、ランニング緩衝液が流れることで、短時間でアナライトが完全に解離するため再生の必要がありません。解離速度が遅い相互作用の場合には、適当な塩、酸、アルカリ溶液を、アナライト結合表面に、30秒～1分間程度添加し再生を行います。至適な再生条件（どの溶液で何分間、何回添加するか）は、分子間ごとに異なるため、その都度検討が必要となります。

理想的な再生条件

リガンドの活性が失われません

アナライトが完全に解離します

リガンドがセンサーチップ表面から遊離しません

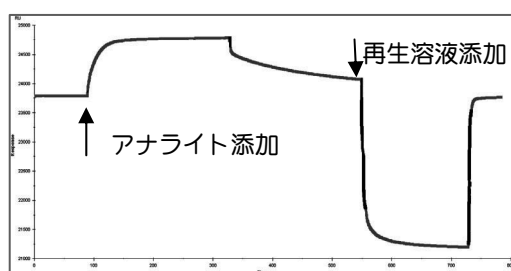
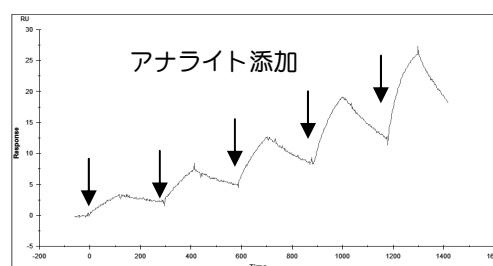
再生溶液は通常以下のようなものが使用されます。検討の際にはマイルドな条件から検討を行います（塩溶液→酸溶液→アルカリ溶液）。添加時間は、1 分以内で検討します。

試薬	濃度あるいは pH
塩条件	
NaCl	< 2 M
酸性条件	
10 mM Gly-HCl	> pH 1.5
HCl	< 100 mM
Phosphoric acid	< 100 mM
Formic acid	< 20 %
アルカリ条件	
10mM Gly-NaOH	< pH 12
NaOH	< 100 mM
Ethanolamine	< 100 mM
Ethanolamine-HCl	< 1 M
キレート剤　多価カチオン依存性反応の場合	
EDTA	< 0.35 M
界面活性剤	
Surfactant P-20 (Tween 20)	< 5 %
Triton X-100	< 5 %
SDS	< 0.5 %
Octylglucoside	< 40 mM
有機溶媒	
Acetonitrile	< 20%
DMSO	< 8%
Ethyleneglycol in HBS buffer	< 50%
Ethanol	< 20%
Formamide	< 40%
変性剤	
Guanidine-HCl	< 5M
Urea	< 8M

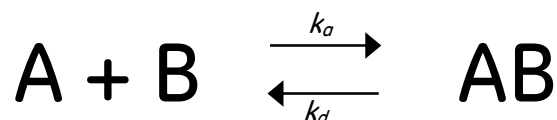
Ⅳ-ⅱ．反応速度定数・解離定数の求め方

マルチサイクル法とシングルサイクル法

1 濃度のアナライト添加とリガンドの再生操作を 1 サイクルとして、濃度が異なるアナライトをくり返し測定し、得られたセンサーグラムから反応速度定数・解離定数を算出する方法をマルチサイクル法と呼びます。一方、異なるアナライト濃度系列を再生操作なしに連続添加し、得られたセンサーグラムを利用して反応速度定数・解離定数を算出する方法をシングルサイクル法と呼びます。

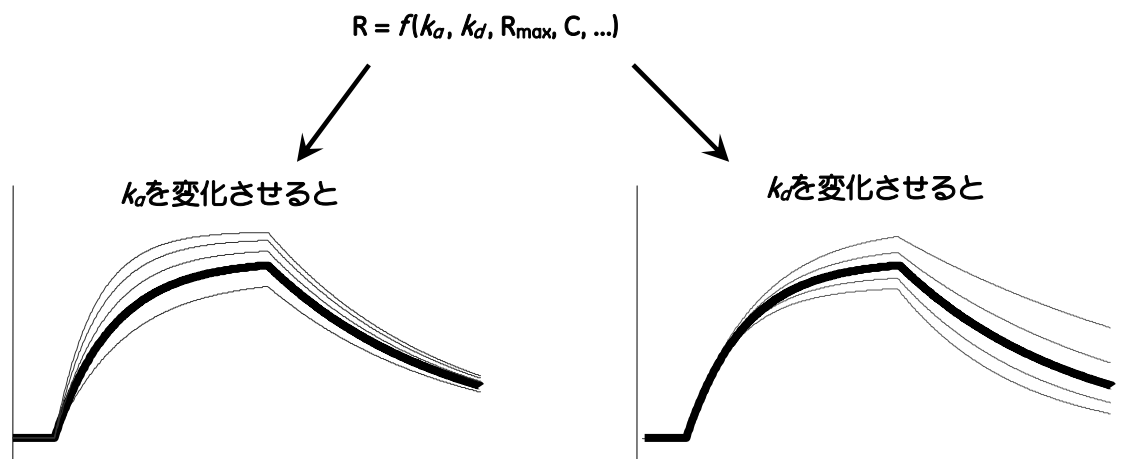
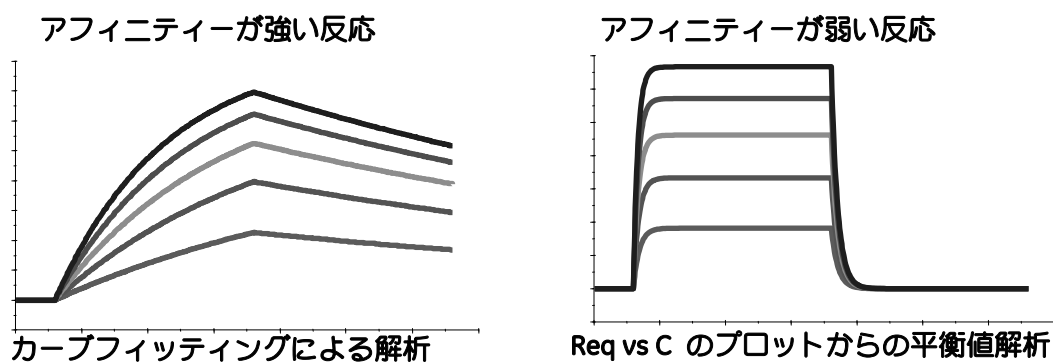
マルチサイクル法

シングルサイクル法

アフィニティーとカイネティクス

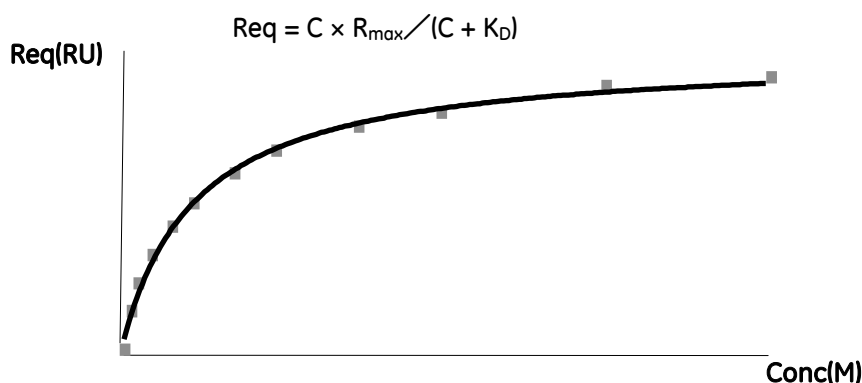
分子同士が相互作用するときには、両者にはアフィニティー（親和性）があると表現します。解離定数は、アフィニティーの強さを表す尺度として一般的に使用され、K_D（単位 M）として記述されます。その逆数 1/ K_D（= K_A、単位 1/M）が用いられることもあります。解離定数は、A+B⇔AB 反応の平衡状態において、K_D = ［A］［B］/［AB］と定義されます。形成される複合体の割合が多いほど、つまり、この数値が小さいほどアフィニティーは強いです。Biacore を用いたカイネティクス解析では、アフィニティーは、その分子間の反応速度定数から算出します（$K_D = k_d / k_a$）。速い結合および遅い解離の相互作用ほどアフィニティーは強いです。これら反応速度（カイネティクス）に関するパラメーターは、結合速度定数（k_a、単位 $M^{-1}s^{-1}$）、解離速度定数（k_d、単位 s^{-1}）として表現されます。

$$A + B \underset{k_d}{\overset{k_a}{\rightleftharpoons}} AB$$

$$K_D = k_d / k_a$$

$$K_A = k_a / k_d$$

解離定数（K_D）、反応速度定数（k_a,k_d）の算出方法

カイネティクス解析では、アナライト全濃度のセンサーグラムに、直接反応速度式をカーブフィッティングさせ、非線形最小二乗近似法により、全体を通して 1 組の反応速度定数を算出する、Global Fitting を用いて定数を導き出します。

アフィニティーが弱い（≒解離が速い）相互作用の場合、反応はきわめて速く平衡状態（Req）へと移行しますが、複合体の安定性は悪いため、センサーグラムは『箱型』となります。結合領域および解離領域はきわめて短く、カーブフィッティングによる反応速度定数の算出は困難です。

このような場合、アナライト濃度（C）に対する平衡値（Req）のプロットから、親和定数（K_A）あるいは解離定数（K_D）を算出します。平衡状態では、以下の関係式が成り立ちます。

$$Req = C \times R_{max} / (C + K_D)$$

至適なアナライト濃度
良好な結果を得るためには、予想される解離定数（K_D）値の 1/10～10 倍の濃度範囲で測定します。結合速度または解離速度が遅く、結合領域のセンサーグラムの傾きが直線的な場合には、センサーグラムのカーブが得られる高濃度領域まで測定すると、良好な解析結果が得られます。

マルチサイクル法の場合
5 段階以上の濃度系列と濃度 0（アナライトを含まない緩衝液のみ）について測定し、1 濃度については再現性の確認目的で 2 回（n=2）測定します。解離定数値が不明な場合は、1 濃度解析を実行し、算出された暫定的な K_D 値から、至適濃度範囲を求めます。

シングルサイクル法の場合
予想される解離定数（K_D）値の 1/10～10 倍の濃度範囲で、5 段階の濃度系列と、濃度 0 を 2 回測定します。解離定数値が不明な場合には、1 nM～1 μM の範囲で、5 倍希釈系列の 5 濃度のアナライトで測定および解析を行い、算出された暫定的な K_D 値から至適濃度範囲を求めるとよいです。その場合、再生ができるのであれば、リガンドを再生して、至適アナライト濃度で再測定を行います。再生ができないのであれば、リガンドを新しいフローセルに固定化し、至適アナライト濃度で再測定を行います。

カイネティクス解析が困難な場合
アフィニティーが弱く、箱型のセンサーグラムになり、カイネティクス解析が困難な場合は、10 段階以上の濃度系列と濃度 0 について測定します。濃度範囲は高濃度側まで幅広くとることを推奨します。

至適な流速
30～60 μl/min の高流速に設定します。

アナライト添加時間と解離時間
通常は、添加 3 分程度、解離 3 分程度であればよいです。ただし、結合速度または解離速度が遅く結合領域のセンサーグラムが直線的な場合には、センサーグラムのカーブを得るために、添加時間を 5～10分程度にするとよいです。また、解離速度が遅く、解離領域の傾きがほとんど確認できない場合には、解離時間を 10～30 分程度にするとよいです。

Ⅳ-ⅲ．低分子化合物アナライトとの相互作用測定

Biacore X100 の有機溶媒耐性

低分子化合物の多くは、水への溶解性が悪く、溶解するのに有機溶媒が必要となります。その際、一般に、ジメチルスルホキシド（DMSO）がよく使われます。添加する DMSO 濃度は 3-5% 程度を推奨します。しかし、最終的な DMSO 濃度は、リガンドの活性や化合物の溶解性を考慮し決定します。ランニング緩衝液に使用できる DMSO 濃度は、10% までです。短時間（3 分間程度）の添加であれば、50% まで耐性があるため、流路の洗浄などには使用可能です。
DMSO を扱う際、DMSO 耐性の容器を使用する必要があります。あるプラスチック類（ポリカーボネイトやポリスルフォン）は、DMSO に溶け出すため、測定中に結合が見られることがあります。DMSO 非耐性の容器を用いると、接触したとたんに腐食し、白濁します。常にそのような問題を考慮し、容器の耐性テストを行うことが望ましいです。
ポリプロピレン製のものは、DMSO 耐性です。

DMSO の推奨グレード

DMSO は、さまざまなグレードが市販されています。DMSO 溶液中の夾雑物も測定に影響をおよぼす場合があるので、グレードの高いもの（UV spectrometry 用など）を使用することを推奨します。
Dimethyl sulfoxide（276855, Aldrich）、Dimethyl sulfoxide（D-1435, Sigma）を用いると良好な結果が得られています。

ランニング緩衝液の調製

【例】ランニング緩衝液　；リガンド固定化時：1X PBS　100 ml 程度
　　　　　　　　　　　　相互作用測定時：1X PBS, 5% DMSO　400 ml 程度

＜調製方法＞

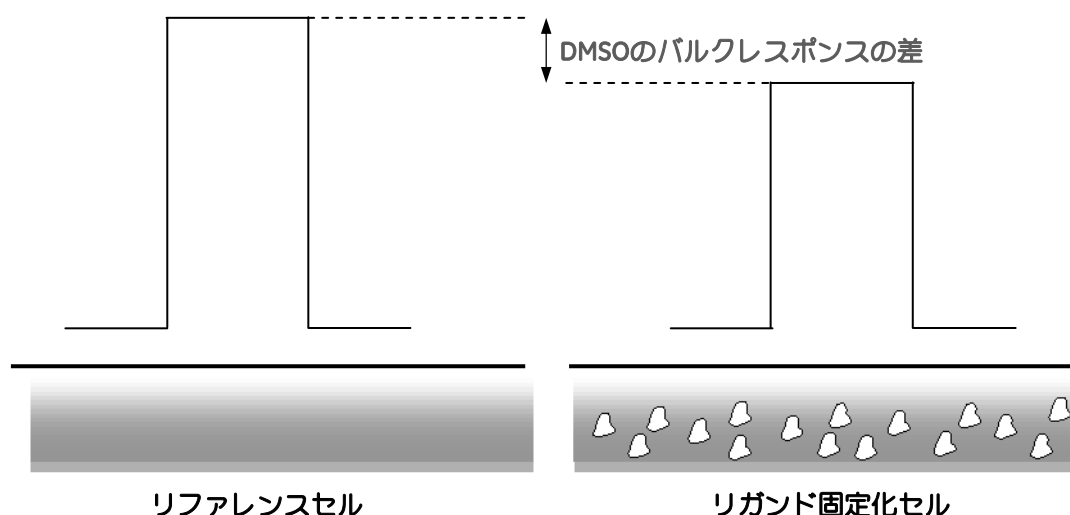
1X PBS を 500 ml 調製（50 ml 10X PBS + 450 ml 超純水）
↓ ⇒ 100 ml 分取（リガンドの固定化に使用）　＊
1X PBS 400 ml
↓ ⇒ 20 ml 分取 ＊2
↓ ⇐ 100% DMSO を 20 ml 添加
1X PBS, 5% DMSO　400 ml ＊3

＊　アミンカップリングを行う際、DMSO 含有緩衝液を使用するとカップリング量が 2/3-1/2 程度に減少します。
＊2　1X PBS 緩衝液をサンプル希釈用に 10 ml 程度取り分けておきます。
＊3　1X PBS, 5% DMSO 緩衝液をサンプル希釈用に 10 ml 程度取り分けておきます。

溶媒補正

（参照：Frostell-Karlsson, A., *et al.* (2000). “Biosensor analysis of the interaction between immobilized human serum albumin and drug compounds for prediction of human serum albumin binding levels.” J Med Chem **43**(10): 1986-92.）

SPR シグナルは、センサー表面でのさまざまな屈折率（RI）の変化を反映しています。センサー表面での結合反応だけでなく、ランニング緩衝液と添加サンプル（アナライト）を溶解している溶媒の屈折率差から生じる、バルクレスポンスが含まれます。
バルクレスポンスが小さい（100 RU 以下）実験では、リガンド固定化セルからリファレンスセルのレスポンスを差し引くだけでこのバルクレスポンスは排除できます。
しかし、厳密には、リガンド固定化セルに添加した溶液は、リガンド分子の占有体積分排除されます（下図）。このとき、溶媒効果が大きい DMSO を含む溶媒の場合、リファレンスセルのバルクレスポンスは、リガンド固定化セルよりも高くなります。

このため、DMSO を含むランニング緩衝液を用いる低分子化合物をアナライトとする実験では、単純にリファレンスを差し引くだけではバルクレスポンスの差を十分に排除することはできません。
実際、このバルクレスポンスの差は小さい（通常 10 RU 以下）ですが、低分子化合物が結合した際に得られる結合レスポンスと同程度であるため、バルクレスポンスの差を補正する必要があります。この補正を溶媒補正（Solvent correction）といいます。

溶媒補正が必要な実験系

溶媒補正は、以下の 3 つの要因が重複した際必要となります。

- 期待されるアナライトの結合レスポンスが小さい（100 RU 以下）場合
- リガンドを高密度（10,000 RU 以上）に固定化した場合
- サンプル溶液に DMSO が含まれるなど、バルクレスポンスが大きく（30,000 RU 以上）、サンプル間で値が異なる場合（DMSO 濃度の“誤差”も含めて）

ランニング緩衝液とアナライト溶液中の DMSO 濃度 1% の違いは、バルクレスポンスの 1,500 RU 程度に相当します。複数あるサンプルを個々に調製する際、DMSO 濃度の誤差が無視できないバルクレスポンスの差を生む可能性があります。

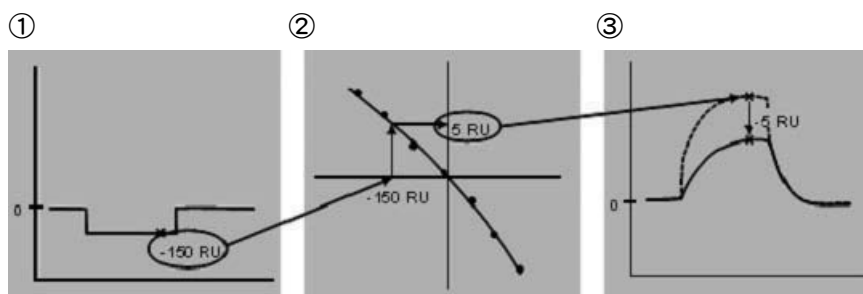
溶媒補正の手順

Biacore X100 Evaluation Software では以下の補正を自動で行います。

測定の際に、DMSO 溶液の濃度シリーズ（ランニング緩衝液に含まれる DMSO 濃度±1% 程度）を、リガンド固定化セルおよびリファレンスセルに添加し、固定化セルとリァレンスセルのバルクレスポンスの差を記録します。

リファレンスセルのレスポンスを x 軸、固定化セルとリファレンスセルのバルクレスポンスの差を y 軸にプロットして溶媒補正曲線を作成します。

低分子化合物を添加した際、リファレンスセルのレスポンス（図①）を溶媒補正曲線に代入して、補正値を算出します（図②）。

相互作用測定で得られた結合レスポンスから、補正値を差し引きます（図③）。

溶媒補正用 DMSO 溶液の調製例

5 % DMSO 含有サンプルを用いる場合の、溶媒補正用 DMSO 溶液の作成方法を記載します。すべての DMSO 溶液は用事調製します。

①1x PBS（no DMSO）を調製します。

②溶媒補正曲線 4 %、6% DMSO ストック溶液を調製します。

4% DMSO ストック溶液	1x ランニング緩衝液	9,600 µl
	100 % DMSO	400 µl
		10,000 µl
6% DMSO ストック溶液	1x ランニング緩衝液	9,400 µl
	100 % DMSO	600 µl
		10,000 µl

③ストック溶液を下記表の割合で混合して､4 %～6 % の溶媒補正用 DMSO 溶液を調製します。以下の表は 8 段階の溶媒補正用 DMSO 溶液を調製する際のプロトコールです。

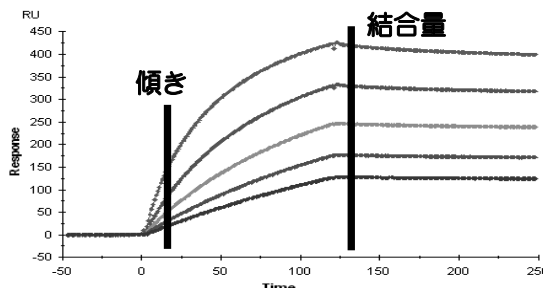
4% DMSO		100	200	300	400	500	600	700	
6% DMSO	700	600	500	400	300	200	100		
	700	700	700	700	700	700	700	700	(µl)

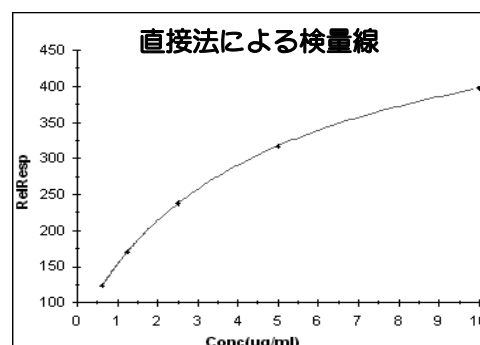
アナライトの調製

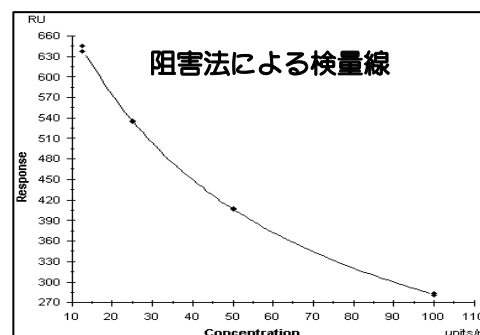
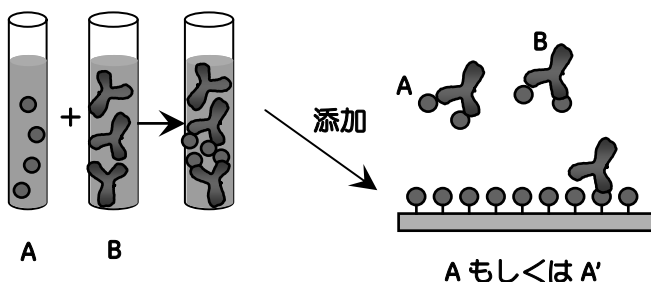
アナライト溶液の DMSO 終濃度を、ランニング緩衝液とあわせます。化合物濃度は、結合スクリーニングが目的の場合、親和性にもよりますが、数十 µM で調製します。反応速度定数の算出が目的の場合、K_D（解離定数）値濃度の 1/10～10 倍の濃度範囲で 5 濃度以上調製します。

Ⅳ-ⅳ．ビアコアを用いた濃度測定

検量線を用いた濃度測定

定量したい分子（A）に対して親和性を持つ分子（B）が必要となります。B を固定化したセンサーチップ表面に A を添加すると、濃度に依存した結合レスポンス（RU）が得られます。数段階の濃度既知の A を添加し、その結合レスポンスを得て、検量線（RU vs C）を作成します。濃度未知の A に対しても同様に添加し、その結合レスポンスを検量線にフィッティングすることで、濃度を算出します。また、A 添加直後のセンサーグラムの傾き（Slop）も結合レスポンス同様に、添加した A の濃度を反映し、Slop vs C の検量線からも定量ができます。

（直接法）

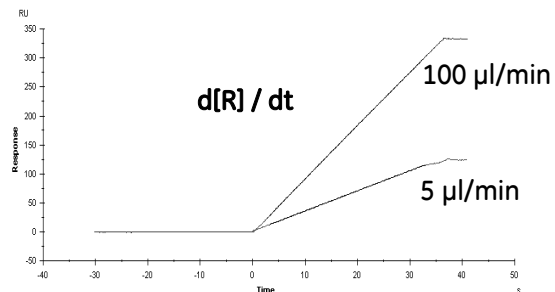
親和性を持つ分子（B）をセンサーチップ表面に固定化し、定量分子 A を添加して得られる結合レスポンスから直接 A の濃度を算出する方法です。

（阻害法）

A もしくは A のアナログ（A’）をセンサーチップに固定し、定量分子 A と A に対して親和性を持つ分子 B（抗体など）を一定量混合した混合液を添加し、未反応の B を測定することで、間接的に存在する A の濃度を求める方法です。化合物やペプチドなど分子量が小さい分子の定量を行う場合に利用します。

<u>検量線不要の濃度測定</u>

検量線を必要としない濃度測定法（**CFCA ; Calibration Free Concentration Analysis**）は、アナライトの拡散特性とセンサーグラムの結合領域初期における結合速度（初期結合速度）を利用して、カーブフィッティングにより、アナライト分子の絶対濃度を算出する方法です。適した標準分子がない場合は、CFCA を実施します。また、標準サンプルがある場合でも、吸光度計などで求められたタンパク質総量の濃度に対し、リガンドに対する結合活性を持つ濃度を求めたい場合に有効です。厳密な速度定数と親和定数を求める目的においても、CFCA により絶対的な結合活性濃度を求め、カイネティクス解析に反映させることができます。

$$\frac{d[R]}{dt} = f\,(M_w,\ k_m,\ Conc)$$

M_W　：分子量(Da)

k_m　：マストランスポート係数

CFCA では、リガンドをできるだけ多く固定化（例：分子量 150 kDa で 5,000 RU 以上）し、マストランスポートリミテーション条件下で測定を実施します。固定化量が多い表面において、初期結合速度は、アナライトの分子量（Mw）、マストランスポート係数（km）、アナライト濃度（Conc）で決定されます。このため、上記の初期結合速度（d[R] / dt）の関数を利用してサンプル中のアナライト濃度を算出することができます。

測定は、アナライトを最低 2 流速（5 および 100 µl/min を推奨）で添加して、センサーグラムから初期結合速度を求めます。マストランスポート係数（km）は、拡散係数（D）、流速、フローセル容積から計算できます。得られた 2 流速でのセンサーグラムを、1:1 結合モデルでカイネティクス解析を行い、アナライトの分子量（Mw）、km 値を定数とし、アナライト濃度をパラメーターとしてカーブフィッティングを行うことで濃度を算出します。なお、アナライトが抗体（Bivalent Analyte）であっても、マストランスポートリミテーション条件下で、カーブフィッティングが良好であれば、CFCA を実施することができます。

参考文献：

Christensen, Anal. Biochemistry (1997)249, p.153

Sigmundsson, K., *et. Al.,* Biochemistry (2002) 41, p.8263

CFCA を実施するための至適条件

① アナライト	分子量　≧ 5,000Da
② 結合速度定数（k_a）	10^7 ＞ k_a ＞ $5 \times 10^4\ M^{-1}s^{-1}$
③ 固定化量	できるだけ多く固定化します。（分子量 150 kDa では、5,000 RU 以上は必要。）
④ アナライト濃度	CFCA で良好な結果が得られる濃度レンジは、0.5～50 nM です。測定に用いるサンプル濃度は、1 μg/ml 程度が至適です。吸光度（280 nm）による総タンパク質濃度を基準として調製します。濃度が不明な場合には、10 倍希釈系列で 4 濃度以上調製するとよいです。
⑤ 流速	10 μl/min および 100 μl/min を推奨。
⑥ サンプルの性状	拡散係数や分子量が大きく異なる分子の混合溶液の場合には CFCA は実施できません。例）アナライトが IgG のポリクローナル抗体の場合には CFCA は可能ですが、アナライトが IgG と IgM の混合溶液の場合には CFCA は不可能です。
⑦ リファレンスセル	リファレンスセルも同時測定を行い、リファレンスセルを差し引いたセンサーグラムを利用します。

補足 1. マストランスポート、マストランスポートリミテーションとは

マストランスポートとは、フローセルを流れる溶液中からセンサーチップ表面への、アナライトの拡散現象を指します。アナライトのセンサーチップ表面への拡散（供給）速度は、次式で求められます。

アナライトの拡散速度（mol/m²s）＝アナライト濃度 × マストランスポート係数（km）

マストランスポート係数は、次式で求められます。

$$k_m = 0.98 \times \sqrt[3]{\frac{D^2 \times f}{0.3 \times h^2 \times w \times l}}$$

D　：拡散係数　　f　：測定流速　　h：フローセルの高さ
w　：フローセルの幅　　l　：フローセルの長さ

なお、アナライトの拡散速度よりも、センサーチップ表面のリガンドとの結合速度が速い場合、マストランスポートが結合速度を制限するため、**マストランスポートリミテーション**が起きているといいます。リガンドの固定化量が多い場合には、マストランスポートリミテーションが起こりやすいです。

補足 2. 拡散係数の求め方

CFCA を行う場合、20℃ における拡散係数がパラメーターとして必要です。
拡散係数は、分子のサイズと形状によって決定され、次式によって算出できます。

$$D = \frac{324.3\times10^{-11}}{f\times\eta_{rel}\times M_w^{1/3}} \quad (m^2/s)$$

f　：摩擦率
η_{rel}　：20℃ での水に対するアナライト溶媒の粘性
Mw　：分子量(Da)

なお、以下の方法でも拡散係数を得ることができます。
① Biacore ウェブの Biacore X100 の拡散係数算出ツール
② 文献値
③ 実験的に算出（超遠心分析や光散乱分析など）

Biacore Web の Biacore X100 の拡散係数算出ツールによる拡散係数の求め方

次のアドレスにアクセスします。
http://www.biacore.com/jp/lifesciences/products/systems_overview/x100/service/index.html
↓

ウェブサイトからのBiacore X100のサポート

Biacore X100コントロールソフトウエアに組み込まれたサポートのホットリンクを通して、Biacore ウェブサイト上の豊富なサポート情報に直接アクセスできます。Biacore X100のシステムコントローラからインターネットへのアクセスができない場合には、このサイトからサポート情報にアクセスできます。

このサイトにアクセスするためにはお客様登録の際にBiacoreシステムについている「プロダクトキー」が登録されていなければなりません。Biacoreウェブサイトのアカウントに登録されていない方は こちら でサインアップしてください。

User ID:
Password:
FORGOT PASSWORD ?　LOGIN

ユーザー名（User ID）とパスワード（Password）を入力して、LOGIN をクリックします。
（事前に、ユーザー登録が必要です。）
↓

Biacore X100

Biacoreでは、サービスプログラム、サポートツール、およびインフォメーションサービスを幅広く取り揃えています。皆様が最適な状態でBiacoreシステムを最大限にご利用できるように万全のサポートを目指しています。

Biacore X100に関連した保守＆サービスについての情報は下のリストからお選びください。

Diffusion Coefficient Calculator Tool

- For the calculation of diffusion coefficients in Calibration-Free Concentration Analysis assays
- Only for users of Biacore X100 Plus Package 2.0 or later (valid product key required)
- Access the on-line tool here

Diffusion Coefficient Calculator Tool の here をクリックします。

↓

画面上で、20℃ における拡散係数を算出します。

① **Molecular weight:**　分子量(Da)

② **Friction ratio:**　摩擦率

〇**Choose molecular shape** にチェックを入れ、

の▼をクリックして該当の値を選択します。以下の、3 項目から選択できます。

- **Globular (1.2)**・・・球形のタンパク質（初期設定値）
  例）抗体など
- **Moderately elongated (1.7)**・・・長いタンパク質
  例）フィブロネクチンやプラスミノーゲンなど
- **Elongated (2.5)**・・・硬く、長いタンパク質
  例）フィブリノーゲンやトロポミオシンなど

〇 **Enter value** にチェックを入れると、任意の値を入力できます。

③ **Viscosity relative to water at 20℃**

20℃ における水に対するアナライト溶媒の粘性。

〇 **Use standard value (1.00)** にチェックを入れると、粘性係数が 1 となります。（初期設定値）

〇 **Enter value** にチェックを入れると、任意の値を入力できます。

①～③の設定が終了したら、 CALCULATE をクリックし計算を実行します。④に計算結果が表示されます。

画面下では、任意の温度における拡散係数から、20℃ における拡散係数を算出することができます。文献や実測によって、20℃ 以外での拡散係数が得られている場合に利用します。

1. セットアップ

1-1. 電源およびソフトウェアの起動

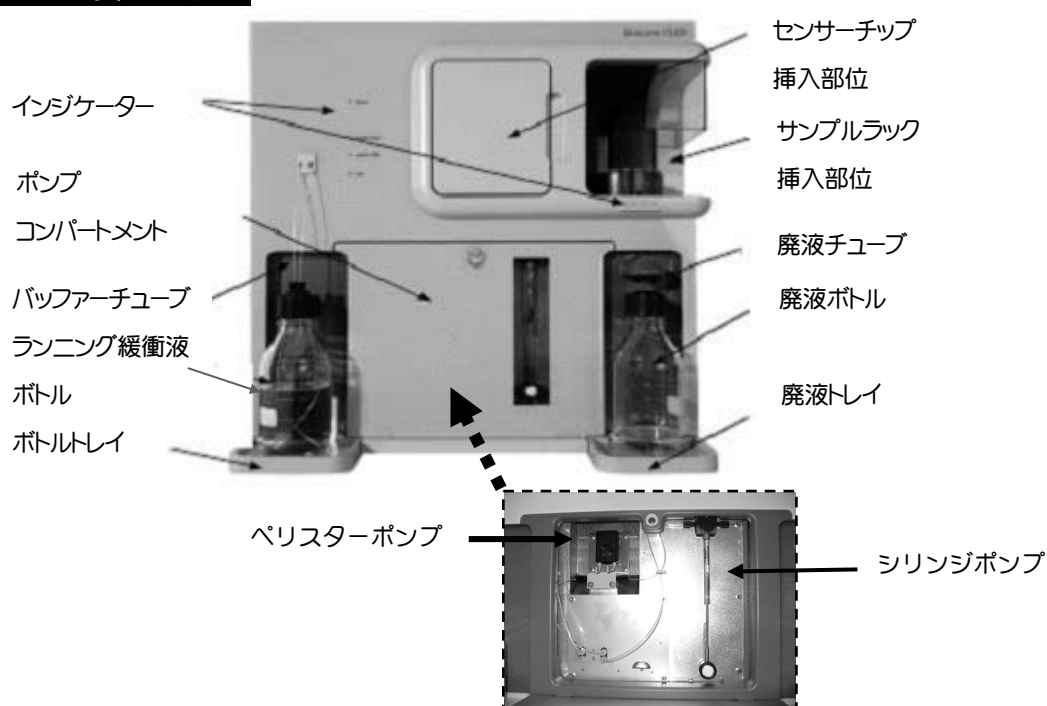
1-1-1. 電源の立ち上げ

テーブルタップの電源 → プリンター → モニター画面 → システム本体 → コンピューターの順番に電源を入れます。パスワード(biacore)を入力し、Windows を立ち上げます。

※　システム本体の電源を入れると、本体の全面左上にあるすべてのインジケーター（LED ランプ）が数秒間点灯し、リセットされて消えます。その後 power のインジケーターが点灯し、temperature のインジケーターは点滅します。

1-1-2. ランニング緩衝液、廃液ボトルのセット

本体に向かって、左側トレイにランニング緩衝液ボトルをセットし、バッファーチューブを 2 本とも挿入します。1 日の実験にランニング緩衝液が約 200 ml 必要です。水分の蒸発を防ぐため、必ずボトルキャップをします。また、右側トレイに廃液ボトルをセットし、廃液チューブを挿入しボトルキャップをします。

補足 1-1. 装置の配置

1-1-3. ペリスターポンプのセット

装置前面下のカバーを開け、ペリスターポンプのカバーを閉じます。

補足 1-2. ランニング緩衝液の種類

各種ランニング緩衝液を販売しています。

HBS-EP+ 10X　（50 ml 4 本, BR-1008-26）

0.1 M HEPES, 1.5 M NaCl, 30 mM EDTA, 0.5 % v/v Surfactant P 20

⇒使用の際には、超純水で 10 倍希釈します。

HBS-P+ 10X　（50 ml 4 本, BR-1008-27）

0.1 M HEPES, 1.5 M NaCl, 0.5 % v/v Surfactant P 20

⇒使用の際には、超純水で 10 倍希釈します。

HBS-N 10X　（50 ml 4 本, BR-1008-28）

0.1 M HEPES, 1.5 M NaCl

⇒使用の際には、超純水で 10 倍希釈します。

HBS-EP　（200 ml, BR-1001-88）

0.01M HEPES, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005 % v/v Surfactant P 20, pH7.4

HBS-P　（200 ml, BR-1003-68）

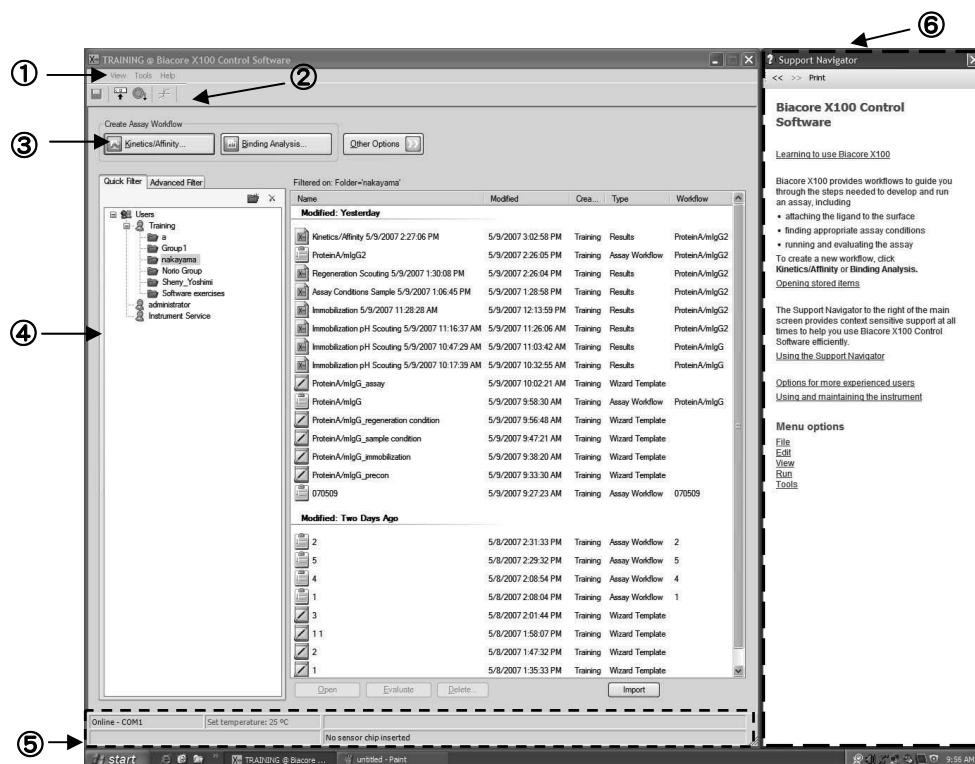
0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, 0.005 % Surfactant P 20, pH7.4

HBS-N　（200 ml, BR-1003-69）

0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, pH7.4

実験目的にあわせ、緩衝液の変更は可能です。各自で調製する場合には、0.22 μm フィルターでろ過します。

1-1-4. コントロールソフトウェアの起動

モニターの初期画面中の左下の Start→Programs→Biacore→BIACORE X100 Control Software のアイコンをクリックします。ユーザー名とパスワードを入力します。スタートビューウィンドウが開きます。初期設定では、ユーザー名が admin、パスワードが administrator で設定されています。各ユーザーの登録については、第 10 章を参照してください。

① メニューバー　　Biacore X100 で実行可能なほとんどの操作コマンドが含まれます。

② ツールバー　　使用頻度の高いコマンドをアイコン化しており、簡便にコマンド操作を選択できます。その時点で実行可能なコマンドのみ選択可能です。

③ アッセイボタン　　アッセイコマンドがアイコン化されています。

④ フィルタータブ　　"Quick Filter"にデータベースを表示します。"Advanced Filters"でデータの検索が可能です。

⑤ ステータスバー　　現在のシステムの状態を表示します。システムとの接続状況、システム温度、センサーチップの種類、実行状態などです。

⑥ サポートナビゲーター　　用語やアイコンなどの説明や実験手順、解析結果の評価などをサポートします。また、ウェブにリンクし、サポート情報の入手やホームページにアクセス可能です。必要がない場合には、ウィンドウ右上の ☒ をクリックすると閉じます。

補足 1-3. ファイルのアイコン

Quick Filter には、以下のファイルが表示されます。
ファイルの種類によって付属のアイコンが異なります。

コントロールソフトウェアで保存した測定ファイル

コントロールソフトウェアで保存したワークフロー

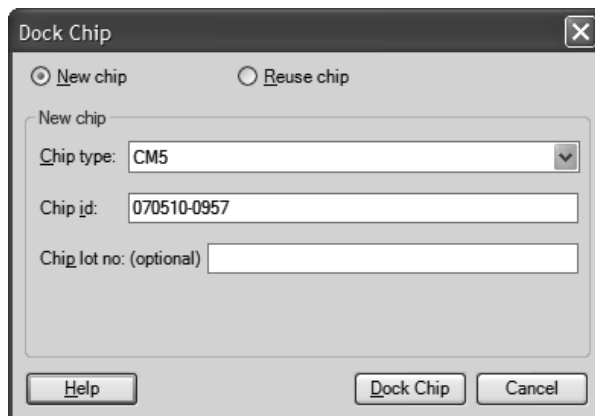
コントロールソフトウェアで保存したウィザードファイル

解析ソフトウェアで保存したファイル

1-2. システムの初期化

1-2-1. センサーチップの挿入

コントロールソフトウェアを起動すると Dock Chip ダイアログが表示されます。

↓

新品のセンサーチップを使用する際は、○New chip に、再利用のセンサーチップの場合は、○Reuse chip にチェックを入れます（再利用のセンサーチップを使用する場合は、補足1-4.を参照してください）。

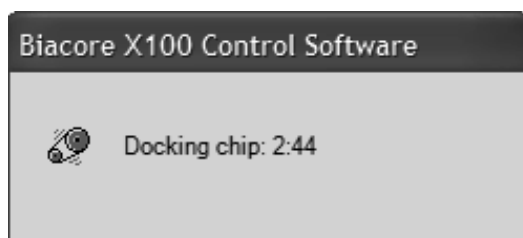
↓

Chip type のプルダウンメニューをクリックして、使用するセンサーチップの種類を選択します。Chip id は日付と時間が自動入力されます（変更可能）。必要に応じて、Chip lot no を入力します。

↓

本体上部のセンサーチップ挿入部位の扉を開け、スライダーを手前に引きセンサーチップをセットします。スライダーを装置に挿入します。インジケーターの sensor chip が点滅します。

↓

Dock Chip ダイアログの Dock Chip をクリックします。

Dock が完了（インジケーターの sensor chip が点灯します）して、自動的に Standby 状態になります。Standby とは、セットしたランニング緩衝液を低流速で流し続けるモードです。最長 7 日間継続します。

補足 1-4. センサーチップ挿入時の注意事項

冷蔵庫に保存しているセンサーチップは、常温に戻した後に Dock します。

センサーチップ内のプラスチックシートがセンサーチップのカバーにしっかり収まっていることを確認してから挿入します。

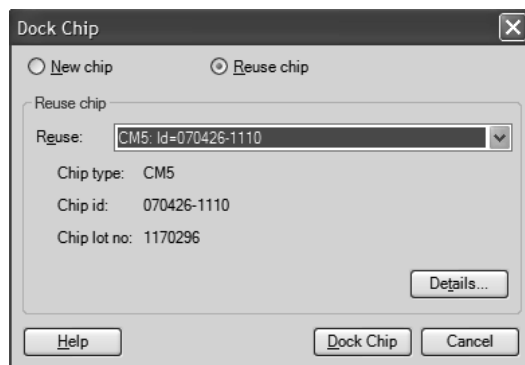
Dock 状態でセンサーチップを装置から取り出さないでください。

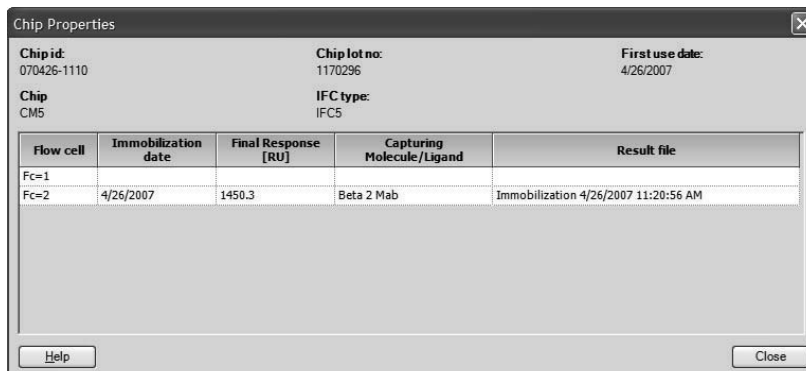
センサーチップを取り出す必要がある場合は、ツールバーの Undock sensor chip アイコン（　）をクリックします。インジケーターの sensor chip が点滅したら、センサーチップを取り出します。

補足 1-5. センサーチップの固定化履歴

再利用のセンサーチップを使用する場合は、○Reuse chip にチェックを入れます。

Reuse:で、そのセンサーチップに対応した id 番号を選択します。

↓

Details...をクリックすると、固定化履歴が表示されます。

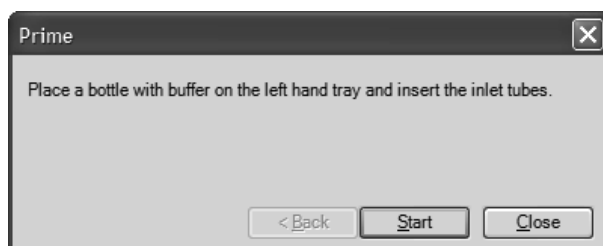
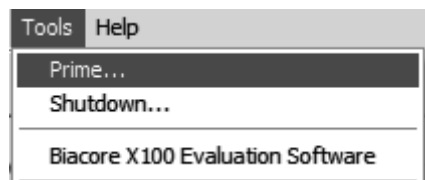
↓

確認後、Close をクリックします。

補足 1-6. センサーチップの種類

Biacore X100 システムで使用可能なセンサーチップは以下の通りです。
各センサーチップの詳細は弊社総合カタログなどを参照してください。

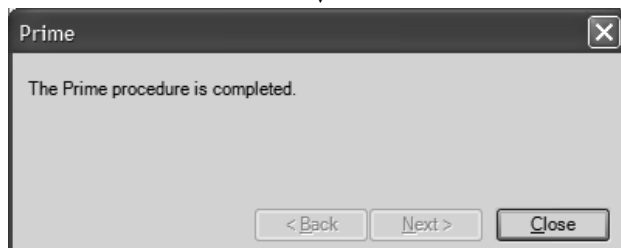
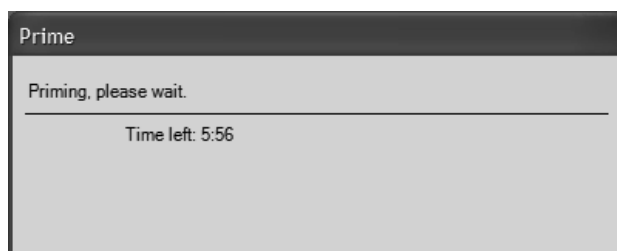
カルボキシル基タイプ	タンパク質、ペプチド、化合物などの固定化	
Sensor Chip CM5（certified）	3 枚	BR-1000-12
Sensor Chip CM5（reserch grade）	3 枚	BR-1000-14
Sensor Chip CM5（reserch grade）	1 枚	BR-1003-99
Sensor Chip CM4	3 枚	BR-1005-39
Sensor Chip CM3	3 枚	BR-1005-41
Sensor Chip C1	3 枚	BR-1005-40
ストレプトアビジンタイプ	ビオチン標識の DNA やペプチドなどの固定化	
Sensor Chip SA	3 枚	BR-1000-32
Sensor Chip SA	1 枚	BR-1003-98
疎水基タイプ	リン脂質、糖脂質、膜タンパク質などの固定化	
Sensor Chip HPA	3 枚	BR-1000-30
Sensor Chip HPA	1 枚	BR-1004-06
Sensor Chip L1	3 枚	BR-1005-43
Sensor Chip L1	1 枚	BR-1005-58
金属キレートタイプ	His-tag タンパク質の固定化	
Sensor Chip NTA	3 枚	BR-1000-34
Sensor Chip NTA	1 枚	BR-1004-07
金表面のみのタイプ		
Sensor Chip Au	3 枚	BR-1005-42

1-2-2. ランニング緩衝液による平衡化

メニューバーの **Tools** → **Prime...**を選択します。

ランニング緩衝液および廃液入れを確認後、**Start** をクリックします。

↓

Prime がスタートします。

↓

Close をクリックします。

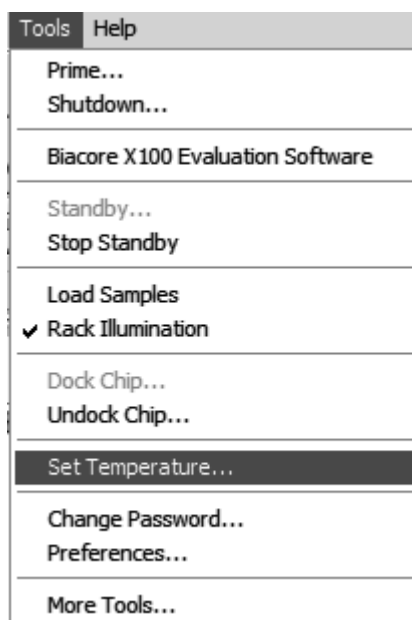
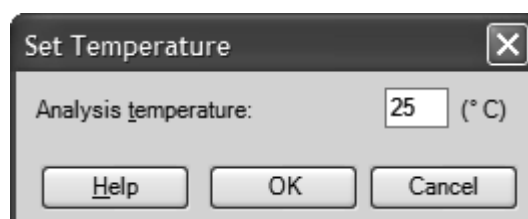
自動的に **Standby** 状態になります。

補足 1-7. 実験途中のランニング緩衝液の交換

Prime は、ポンプやマイクロ流路系、オートサンプラーなどをランニング緩衝液で洗浄、置換する操作です。実験開始時や実験の途中でランニング緩衝液を変更する場合には必ず実行します。

1-2-3. 温度設定

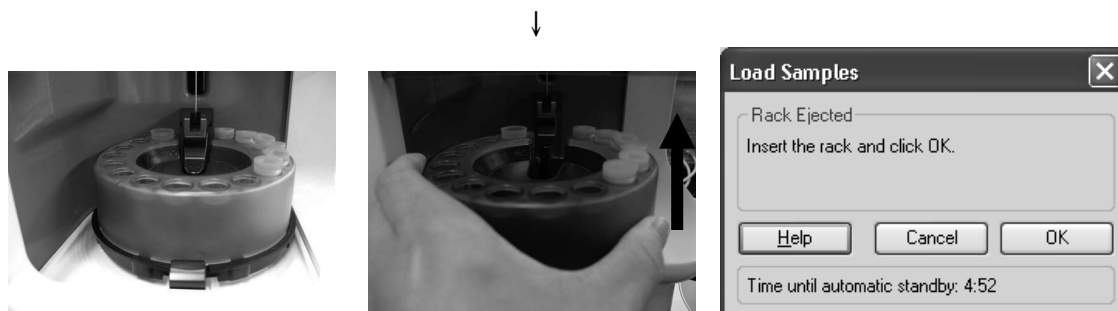
温度設定を行います。
メニューバーの **Tools** → **Set Temperature...**を選択します。

↓

4℃～40℃ の範囲で設定して、**OK** をクリックします。（ただし、実際の常温より 10℃ 下までの範囲で設定します。）

補足 1-8. 設定温度と実際の温度

設定温度に達していない場合は画面上のステータスバー中の温度表示が赤の点滅、本体インジケーターの temperature ランプが橙色に点滅します。設定温度で安定した場合には、画面上の温度の表示が黒、インジケーターの temperature ランプは点灯に変わります。
温度が完全に安定するには、ある程度時間を要します（常温より 5℃ の違いで、30 分程度です）。常温が測定温度と大きく異なる場合は、あらかじめシステムの電源を入れておきます。

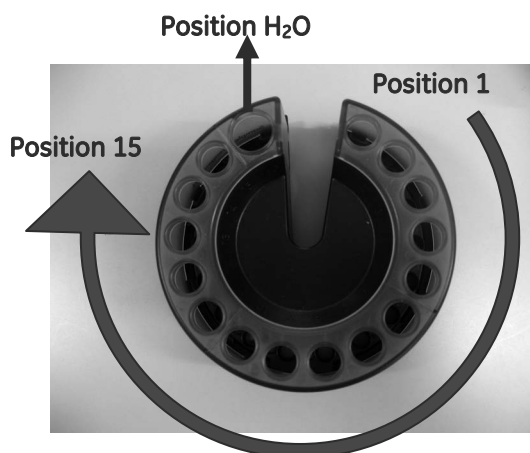
1-2-4. サンプルのセットとラックの取り出し

すべてのサンプルは、ラックにセットします。ラックを取り出すには、ツールバーの **Load Samples** アイコン（ ）をクリックします。システム本体前面の **rack locked** のランプが消えるとラックを取り出すことができます。**rack locked** のランプが点灯している際は、ラックを取り出すことができないので注意します。
ラックを真上に持ち上げ取り出します。

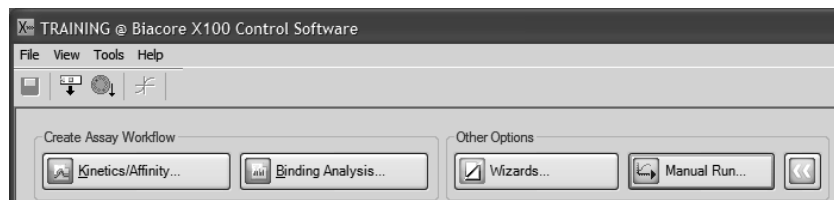
↓

画面上に **Rack Ejected** ダイアログが表示されます。ラックをセット後、**OK** をクリックします。13 秒後にロックが完了し、**rack locked** のランプが点灯します。
なお、ラックベースのライトの点灯は、**Tools** → **Rack Illumination** で選択可能です。

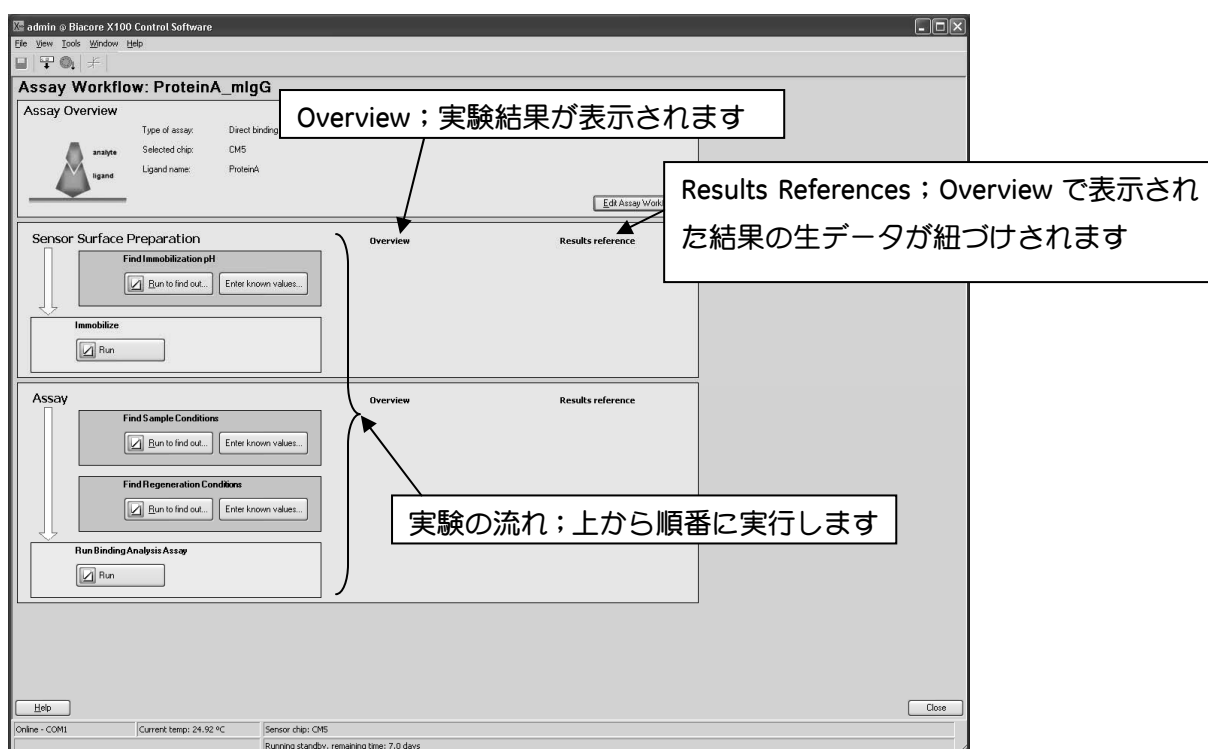
補足 1-9. ラックとバイアル

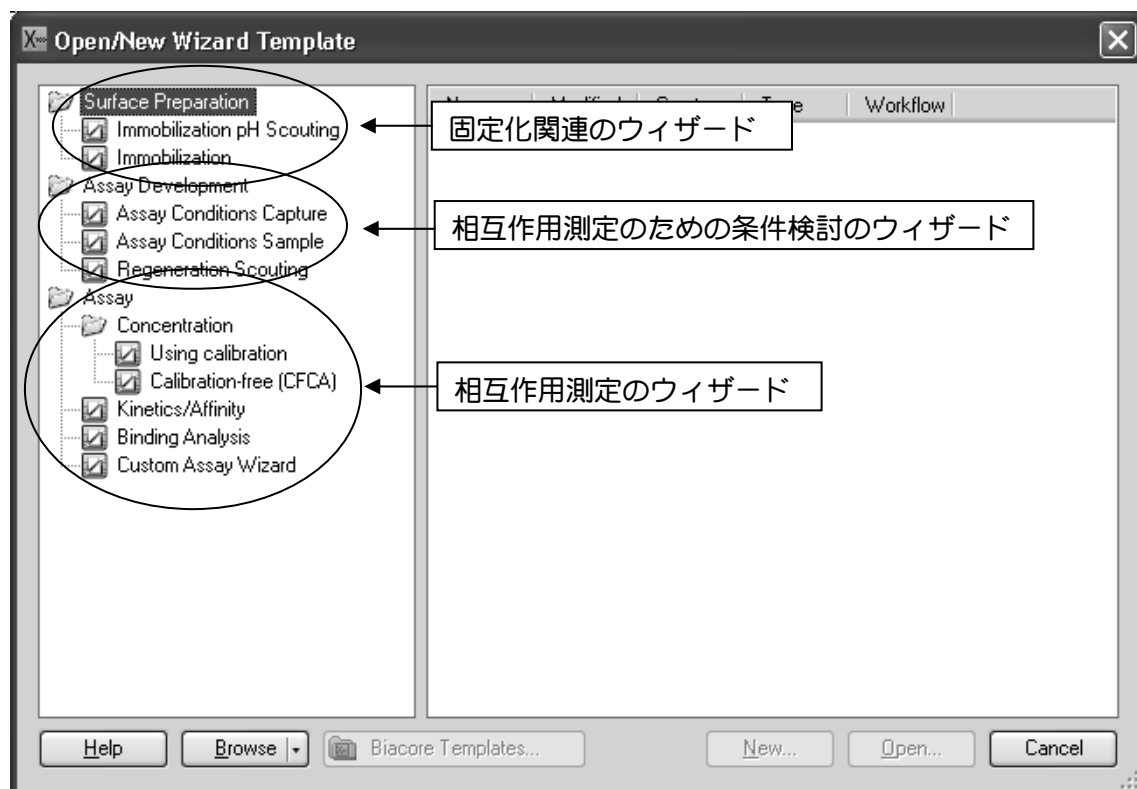
ラックには、サンプルバイアルを 15 本（position 1 から position 15 まで）とニードル洗浄に利用する超純水バイアル（position H_2O）を 1 本セットできます。

ラックには次のバイアルがセットできます。専用のキャップを利用します。パラフィルムなどニードルの穴を塞ぐ可能性のあるシールは使用しません。

Rack position	1-15	H_2O
キャップ	Rubber caps, type 2 BR-1004-11	不要
バイアル	1.5 ml Plastic Vials BR-1002-87	15 mm Plastic Vials BR-1006-54

1-3. 測定モード

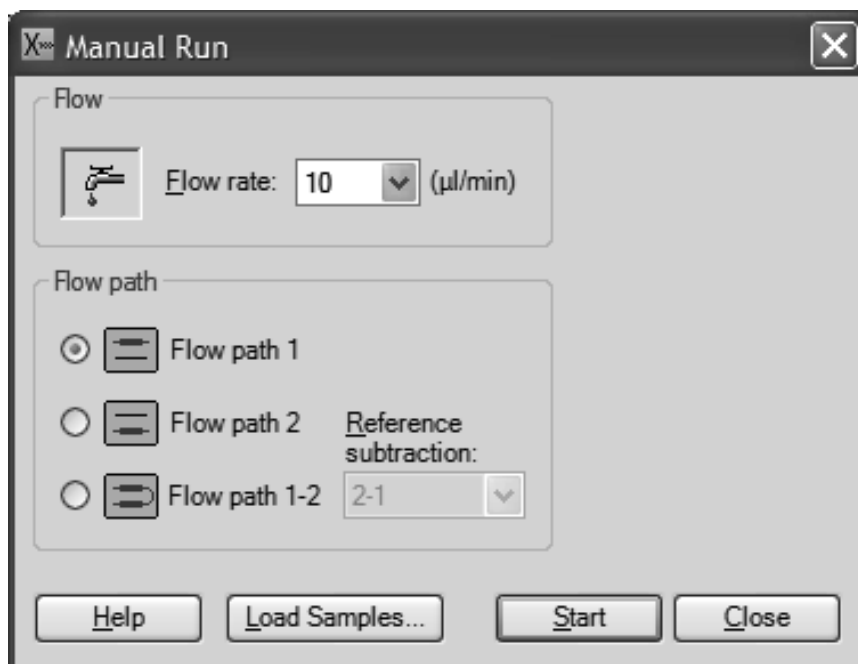
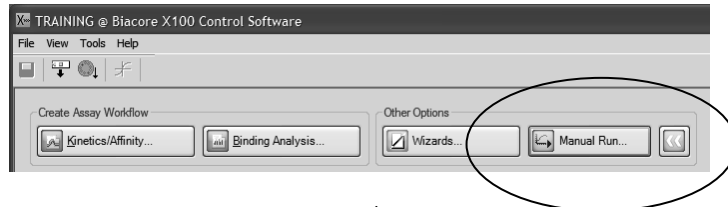
Biacore X100 システムは 3 つのモードで測定できます。
各測定モードは、コントロールソフトウェア上部のアイコンで選択します。

マニュアルモード
画面上のアイコンを使い、測定を行いながら操作します。簡単な検討など、数回の添加で完了する試験を行う場合に有効です。詳細は、第 2 章を参照してください。
（※　取得データは、解析ソフトウェアで解析することができないので注意します。）

ワークフローモード
実験ノートを使用する場合と同じ感覚で、実験結果を記録することができます。はじめてビアコアの実験をする場合でも、流れに沿って各ステップを実行すれば、データの取得までたどり着くことができます。実験の流れが表示され、さらに各ステップから実験プログラムの作成および実行が可能です。また、得られた結果が紐づけされるので、結果の再確認で間違えることがありません。Biacore X100 では、反応速度定数の算出実験およびスクリーニング実験については、ワークフローが存在します。

<u>ウィザードモード</u>

ガイダンスにしたがいながら、任意の実験条件を入力して実行させるオートモードです。ワークフローに紐づけされているプログラムも、ウィザードが基本になっています。ワークフローを使用せず、実験内容に応じてプログラムを作成する場合、ワークフローより自由度の高い実験系を構築する場合に有効です。

2. 基本操作（マニュアルモード）

2-1. 測定の開始

Other Options の **Manual Run...**をクリックします。

↓

Manual Run ダイアログが表示されます。

Flow rate: をクリックして、5、10、30 µl/min より選択します（固定化の際は 10 µl/min、反応速度定数の算出実験の条件検討の際は 30 µl/min を選択します)。

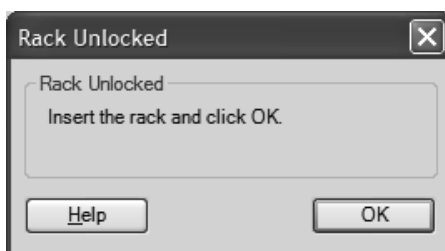
Flow path: 測定を行うフローセルを選択します。

Flow path1 フローセル 1 のみ測定

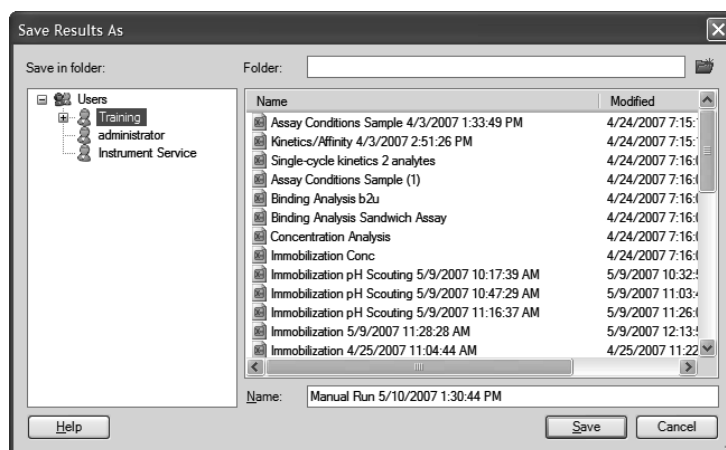
Flow path2 フローセル 2 のみ測定

Flow path1-2 フローセル 1 および 2 を測定

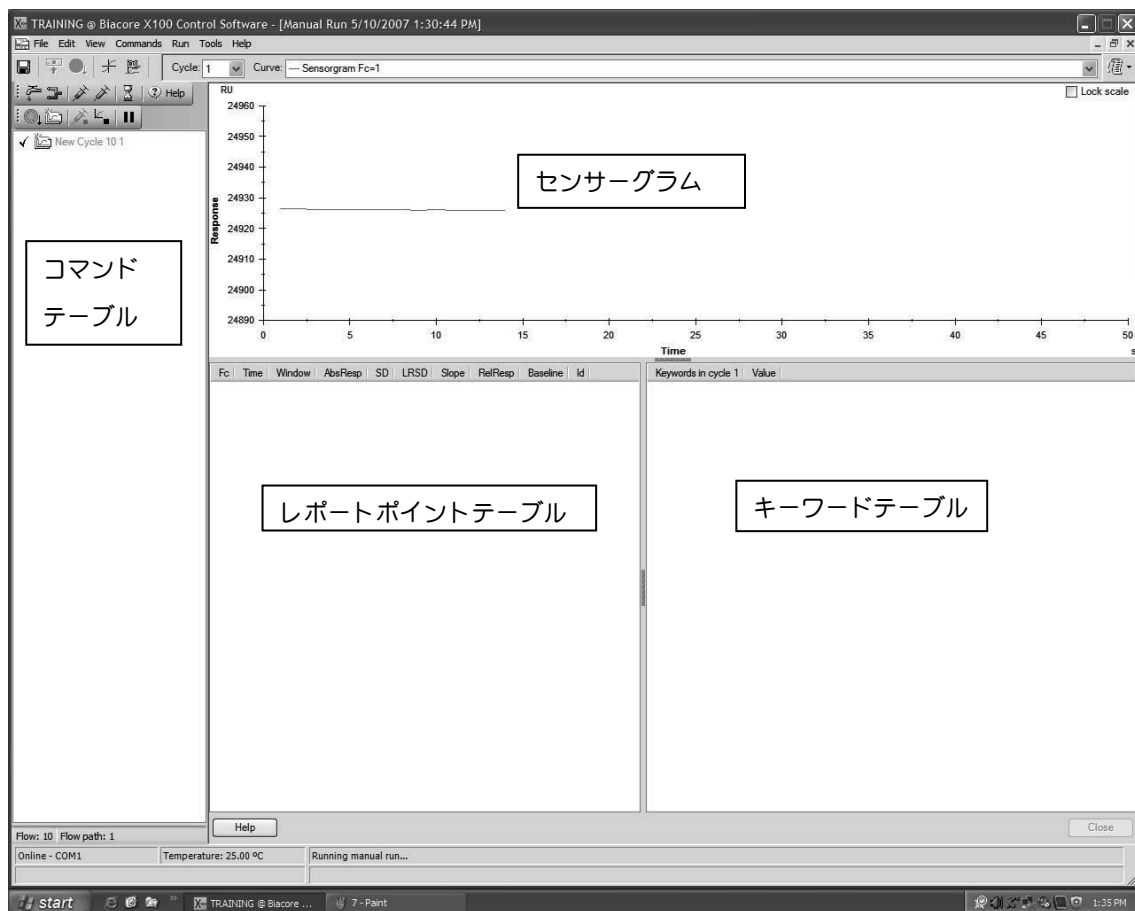
Reference subtraction のプルダウンメニューで 2-1 を選択すると、自動差し引きしたセンサーグラムを表示することができます。

Load Samples...をクリックします。

ロックが解除されます。装置右上の“rack locked”のランプが消えてから、サンプルラックを取り出します。ラックにサンプルをセットし、ラックを装置に戻します。OK をクリックします。

引き続き、Manual Run ダイアログの Start をクリックします。

↓

結果の保存先を指定し、ファイル名を入力します。

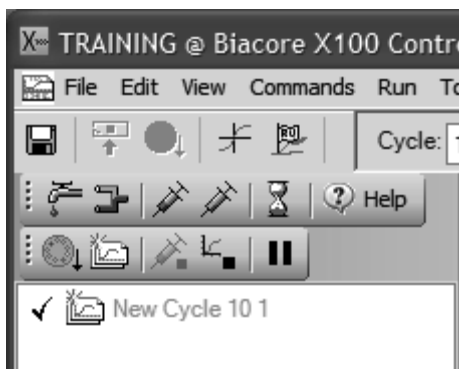
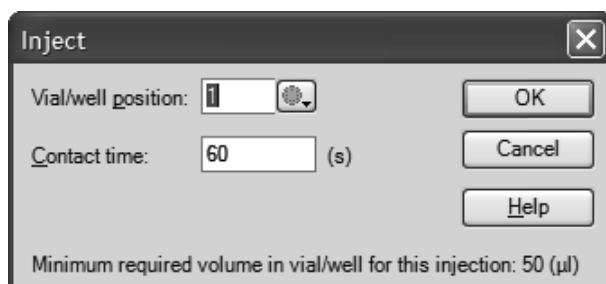
Save をクリックすると、測定が開始します。

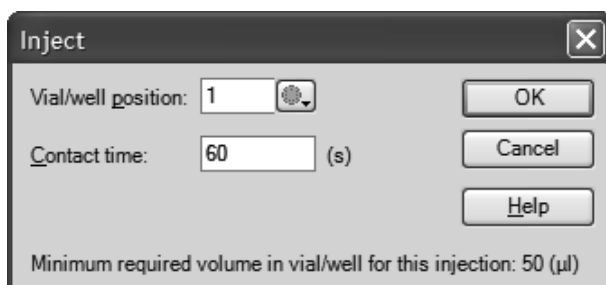
↓

センサーグラムが表示され、測定が開始します。

2-1-1. サンプルの添加

画面左上のアイコンを選択して、測定コマンドを指定します。(各コマンドの説明は補足 2-1. 17 ページを参照してください。または、 Help をクリックしサポートナビゲーターを参照してください。)

Injection command をクリックします。

↓

Vial/well position をクリックし、サンプルをセットする位置にマウスを移動しクリックします。

↓

Contact time:にサンプル添加時間(秒)を入力すると、必要量がダイアログ下部に表示されます。OK をクリックします。

補足 2-1. コマンドの説明

；流速の選択（流速 5、10、30 μl/min から選択）

；流路の切り替え（Detection1,2 に設定している場合利用可能）

；サンプル添加　（赤いシリンジ）

；再生溶液添加　（青いシリンジ）

；待機（次の操作コマンドを実行するまでの時間を任意で設定できます）

；ヘルプボタン（Support Navigator を表示）

；サンプルラックの取り出し

；サイクルの切り替え。センサーグラムを新たにスタートします。

；添加の中止（サンプルおよび再生溶液添加時に実行可能）

；測定の終了（すべてのコマンドの実行後に、Standby 状態に入ります）

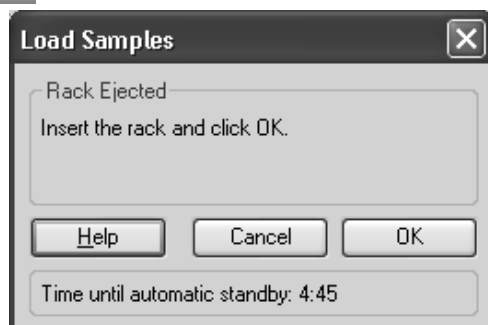
；一時停止（予約コマンドの一時停止が可能）

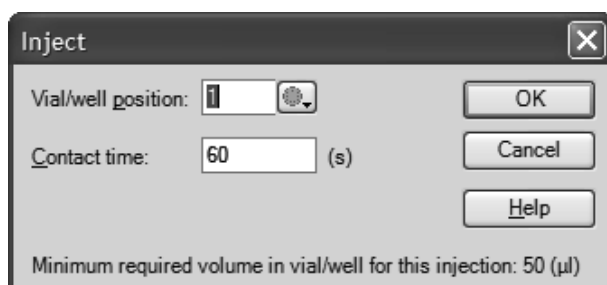
；再スタート（一時停止の解除）

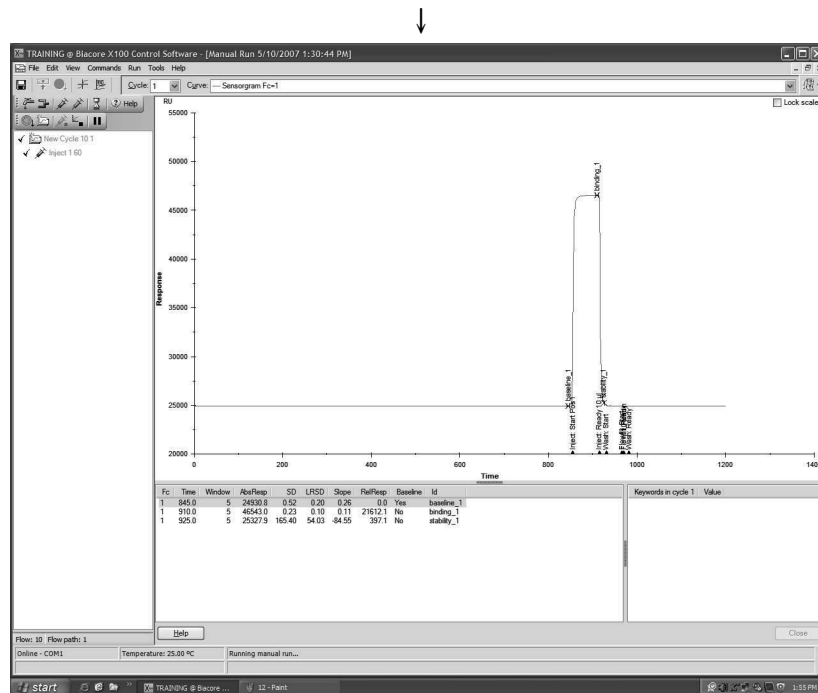
コマンドは、コマンドテーブルに任意で追加が可能です。追加されたコマンドは、上から順番に実行されます。実行中のコマンドは、　がつきます。実行が終了したコマンドは、✓ がつきます。

（測定を開始した後に、サンプルをラックにセットする場合は、一旦、**Cancel** をクリックし、**Inject** ダイアログを解除します。）

↓

Load Samples アイコン を選択します。

ラックを取り出し、必要量以上のサンプルを分注したバイアルをセットします。
ラックを再び装置にセットし、**OK** を選択します。再び、**Injection command** をクリックします。

↓

サンプル位置および添加時間（秒）を入力します。

↓

コマンドテーブルに **Injection command** マークが追加され、添加が開始されます。

↓

必要に応じて、引き続きサンプルを添加します。

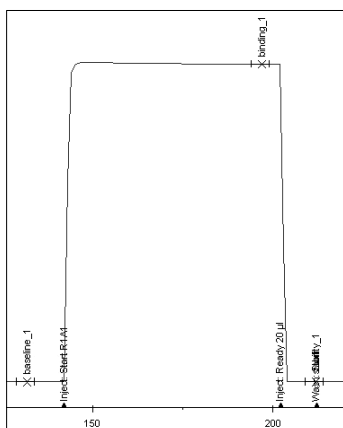
補足 2-2. イベントログ

センサーグラムの X 軸上には、試料添加開始・終了や流路の洗浄などのログも自動入力されます。センサーグラム右上の（　　）をクリックするとイベントログの詳細を確認できます。

2-1-2. レポートポイントの追加

任意の時間におけるシグナルの値（RU）をレポートポイントといいます。レポートポイントは、レポートポイントテーブルに表示されます。レポートポイントはサンプル添加前後で自動取得されますが、任意で追加することができます。

補足 2-3. 自動取得されるレポートポイント

サンプル添加を行った場合、自動的に次の時点でのレポートポイントがレポートポイントテーブルに取得されています。

（レポートポイントテーブル）

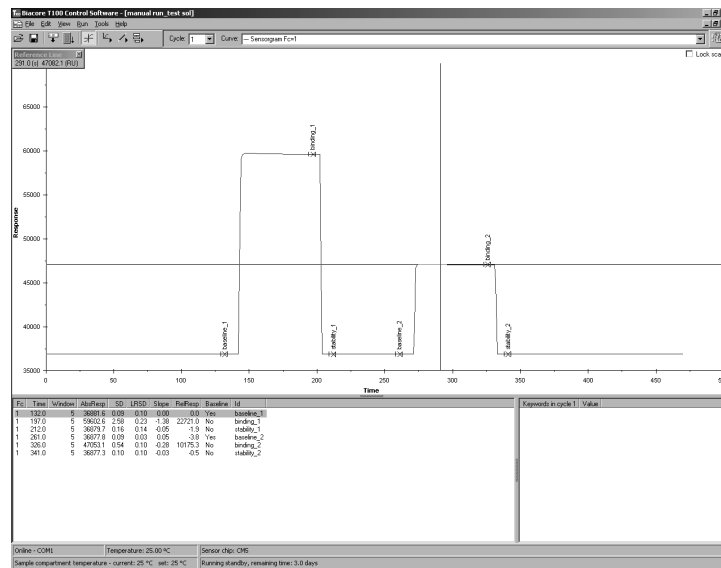
Fc	Time	Window	AbsResp	SD	LRSD	Slope	RelResp	Baseline	Id
1	132.0	5	36881.6	0.09	0.10	0.00	0.0	Yes	baseline_1
1	197.0	5	59602.6	2.58	0.23	-1.38	22721.0	No	binding_1
1	212.0	5	36879.7	0.16	0.14	-0.05	-1.9	No	stability_1

Id（レポートポイント名）

baseline_1	開始 10 秒前
binding _1	終了 5 秒前
stability _1	終了 10 秒後

“baseline_1”時のセンサーグラムの高さ（RU）は “0（ゼロ）RU”（RelResp 0.0）に自動設定されます。“binding_1”もしくは“stability_1”の RelResp は、“baseline_1”からの相対値（RU）を示しています。
2 つ目のサンプル添加時のレポートポイント名は、“baseline_2”“binding_2”“stability_2”となり、RelResp は、“baseline_2”からの相対値（RU）となります。

ツールバーの **Reference line**（ またはメニューバーの **View** → **Reference Line** をクリックして、センサーグラム上にリファレンスラインを表示します。

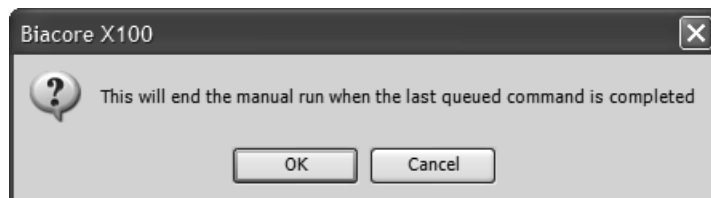
↓

マウスのカーソル（矢印）をリファレンスラインの縦線に合せ、クリック後に任意の時間までドラッグします。または、任意の時間上のセンサーグラムをクリックし、リファレンスラインを移動します。

↓

ツールバーの **Add Report point** アイコン（ ）またはメニューバーの **Edit** → **Report point** の **Add** をクリックします。

Id:	レポートポイント名
Baseline;	相対値 0（ベースライン）に設定する場合はチェックを入れます。

2-1-3. 測定の終了

サンプル添加終了後、**End manual run** アイコン（ ）またはメニューバーの **Run → Stop Run...**をクリックします。

OK をクリックします。指定したコマンドをすべて実行した後に、**Standby** 状態になります。

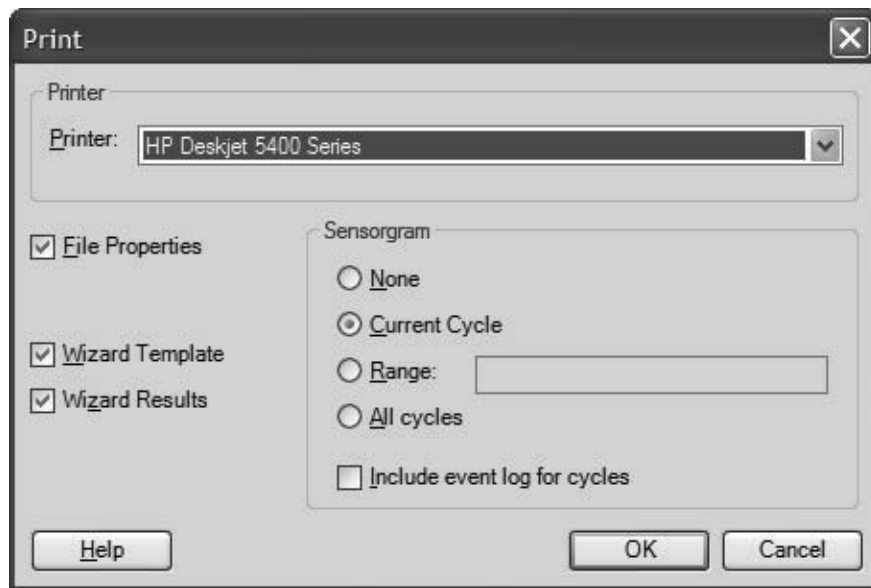
2-1-4. Standby の終了

Tools → Stop Standby...をクリックします。

2-2. ファイルの保存

得られたセンサーグラムは測定終了時に自動保存されます。
追加したレポートポイントを上書き保存するには、メニューバーの **File** → **Save** を実行します。

2-3. データの印刷

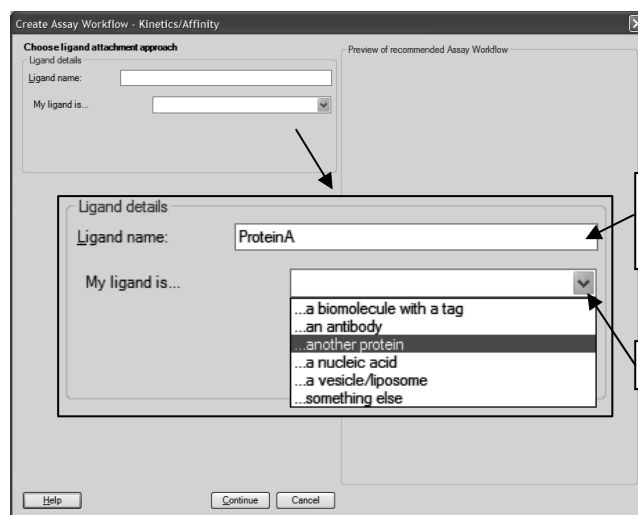
File → **Print…**をクリックします。

印刷したい項目にチェックを入れ、OK をクリックします。

File Properties	ファイルプロパティを印刷
Wizard Template	測定内容を印刷
Wizard Results	測定結果を印刷
Sensorgram	
None	センサーグラムの印刷なし
Current Cycle	表示されているセンサーグラムを印刷
Range	複数サイクル存在する場合に必要なセンサーグラムを印刷
All cycles	すべてのセンサーグラムを印刷
Include event log for cycles	イベントログを印刷

3. 反応速度定数・解離定数の算出

3-1. ワークフローの作成

Create Assay Workflow の、 Kinetics/Affinity...を選択します。

↓

Kinetics/Affinity のダイアログが表示されます。
上記項目を入力します。

↓

補足 3-1. キャプチャー法によるリガンドの固定化

あらかじめセンサーチップ上に固定化したキャプチャー分子に、リガンドを補足する方法を、キャプチャー法と呼びます。
ワークフロー作成の、"Ligand details"の"My ligand is..."で、以下のリガンドの種別を選択すると、"Ligand attachement approach"に推奨する固定化方法が表示されます。

・...a biomolecule with a tag

My ligand is tagged with... （リガンドのタグ名）	推奨固定化法
...biotin	・Sensor Chip SA に固定化 ・Biotin CAPture kit によるキャプチャー（28-9242-33）
...GST	・抗 GST 抗体によるキャプチャー （GST capture kit, BR-1002-23）
...his	・Sensor Chip NTA に固定化
...another tag	・抗タグ抗体によるキャプチャー ・直接固定化

・...an antibody

My antibody is ...（抗体の種別）	推奨固定化法
...a mouse antibody	・抗マウス抗体によるキャプチャー （Mouse Antibody Capture Kit, BR-1008-38）
...a human antibody	・抗ヒト抗体によるキャプチャー （Human Antibody Capture Kit, BR-1008-39）
...another antibody	・抗体認識抗体によるキャプチャー ・直接固定化

・...another protein
　　リガンド認識抗体によるキャプチャーまたは直接固定化

キャプチャーキットを利用する場合は、キャプチャー分子の固定化の条件検討の必要がありません。添付説明書にしたがい、Immobilize ウィザードで固定化を行います。キャプチャーキット以外のキャプチャー分子の固定化を行う場合は、直接リガンドを固定化する場合と同様に条件検討が必要となります。
なお、キャプチャー分子は、フローセル 1 および 2 に固定化を行います。ウィザードは、自動的にフローセル 1, 2 に固定化する設定になっています。

ここでは、**Immobilize ligand covalently using Sensor Chip CM5** を選択します。

↓

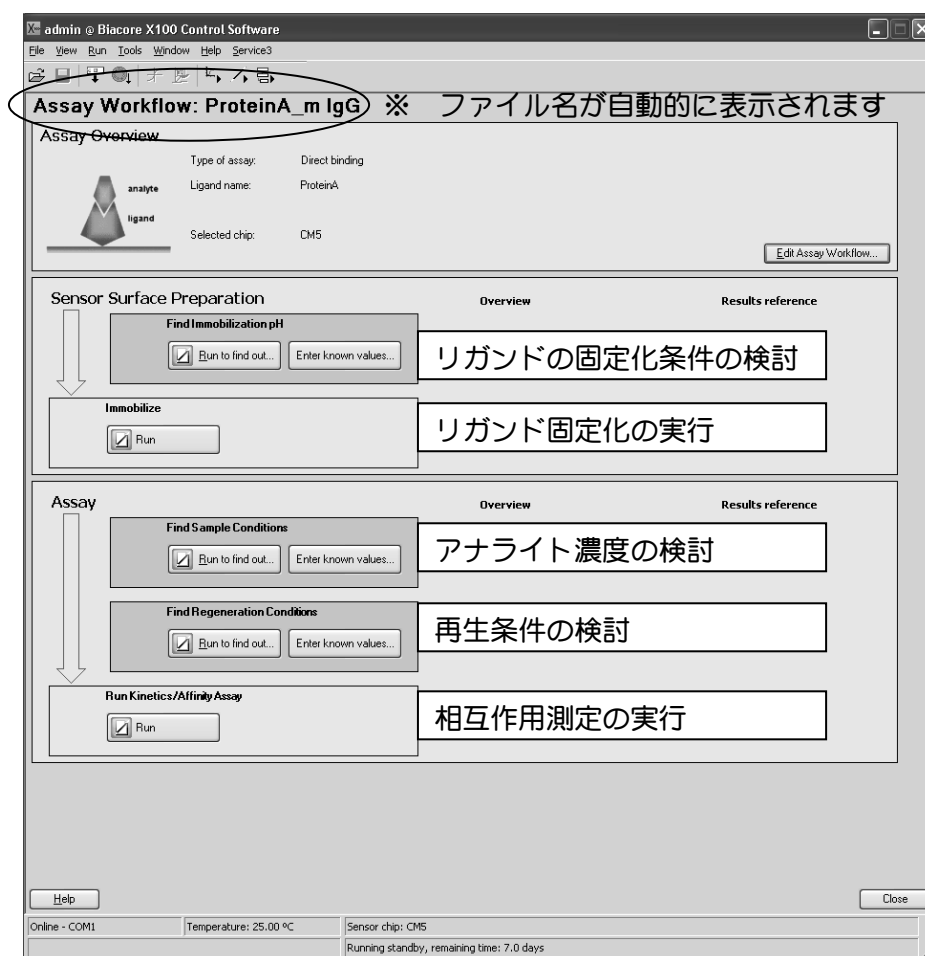
ダイアログ左下に **Ligand attachment overview**、右側に **Preview of recommended Assay Workflow** が現れます。測定の流れを確認します。

Continue をクリックします。

↓

作成したワークフローの保存先を指定します。

ワークフローを保存すると、その後、このワークフロー上で実施した測定条件や試験結果などは、紐づけして記録されます。**Save** をクリックします。

↓

すべてのステップにおいて、**Run to find out...**もしくは **Run** から、対応するウィザードを呼び出して実行します。得られた結果は、**Overview** に表示され、**Results reference** からデータを見ることができます。条件検討のステップで、すでに条件がわかっている場合は、**Enter known values...**から条件を入力すると、**Overview** に表示されます。

3-2. リガンド希釈液の pH 選択

リガンド希釈液の pH 選択方法の詳細については、Ⅲ - ii .（実験をはじめる前に　F ページ）を参照してください。
ワークフローの **Sensor Surface Preparation** のウィザードを実行します。

↓

Find Immobilization pH の **Run to find out...**をクリックします（すでに固定化緩衝液が決まっている場合には、**Enter known values...**をクリックして、条件を入力します）。

Next>をクリックします。

↓

Next>をクリックします。

↓

Rack Positions ダイアログが表示されます。テーブルにしたがいサンプルをラックにセットします。

Next>をクリックします。

↓

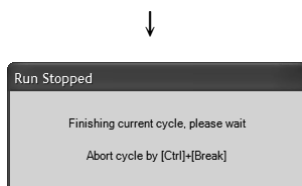
確認画面が表示されます。確認後、Start をクリックします。

↓

結果の保存先とファイル名を指定後、Save をクリックします。測定の中断をする場合は、補足 3-2.（30 ページ）を参照してください。

↓

補足 3-2. 測定の中断

測定を中断する場合、ツールバーの **Run** → **Stop Run...**をクリックします。

↓

Stop Run をクリックします。

↓

測定中サイクルの全コマンドを実行後、**Standby** 状態になります。

全コマンド実行を待たずに測定を中止したい場合には、キーボードの[Ctrl]キーと[Break]キーを同時に押します。

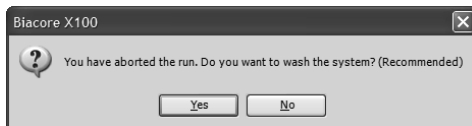
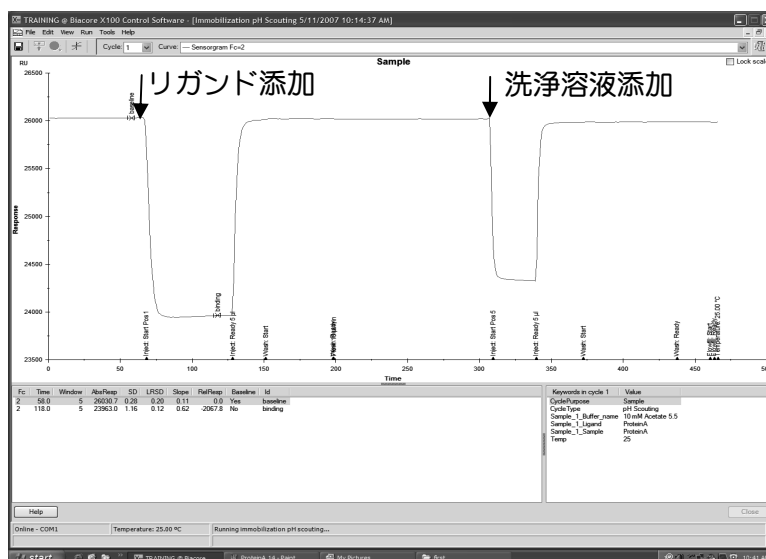
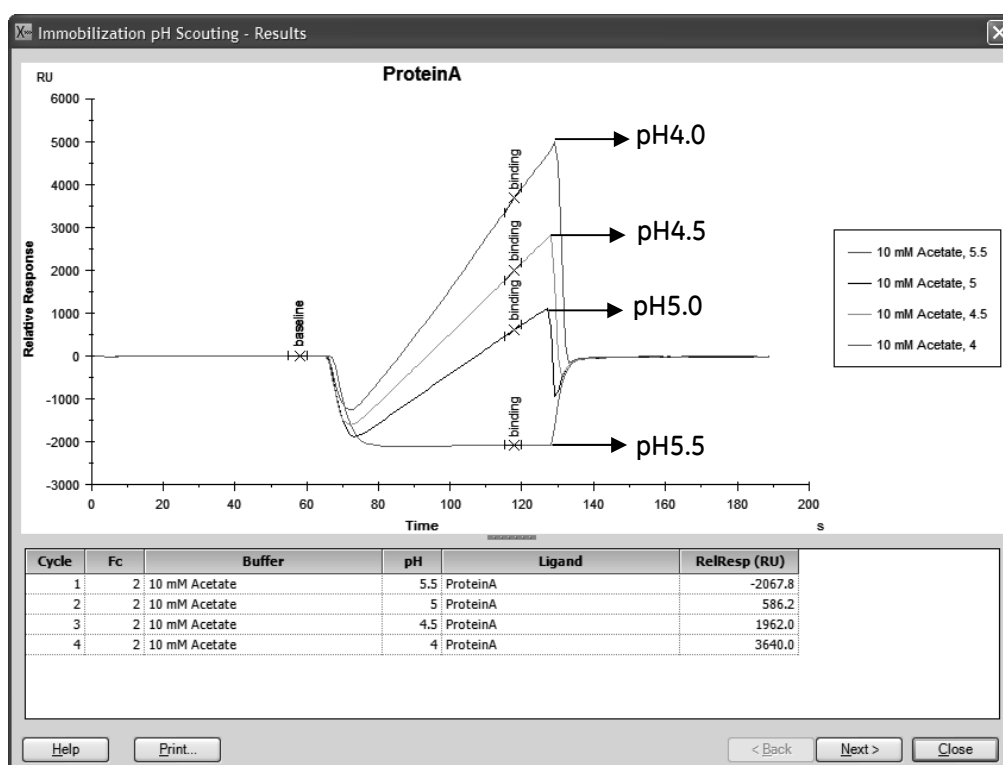
↓

システムの洗浄を行う場合には、**Yes** をクリックします。洗浄後停止します。

上記サイクルを 1 サイクルとして、指定した緩衝液の測定を行います。

↓

測定が終了すると、システムは自動的に **Standby** 状態となります。**Standby** の終了方法は、2-1-4. （22 ページ）を参照してください。また、**Results** ダイアログが現れます。

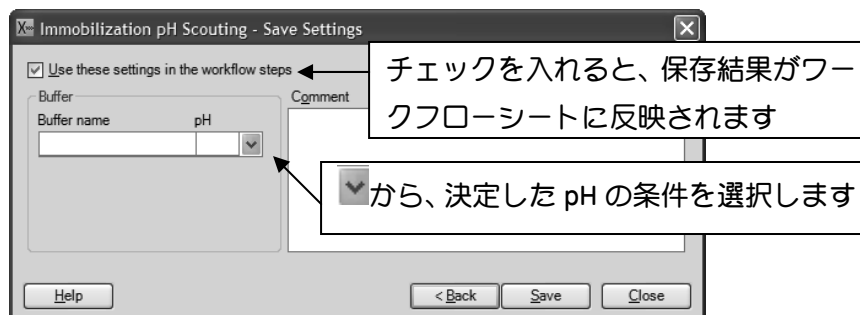
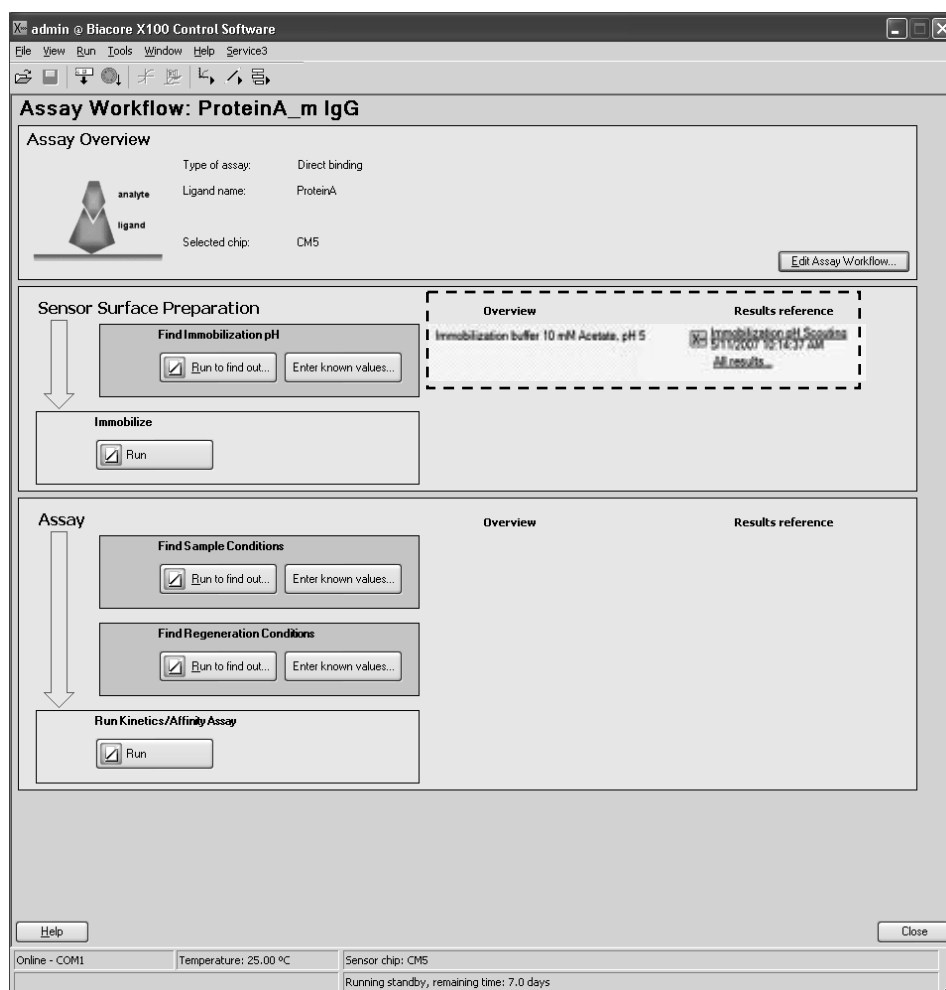
Cycle	Fc	Buffer	pH	Ligand	RelResp (RU)
1	2	10 mM Acetate	5.5	ProteinA	-2067.8
2	2	10 mM Acetate	5	ProteinA	586.2
3	2	10 mM Acetate	4.5	ProteinA	1962.0
4	2	10 mM Acetate	4	ProteinA	3640.0

各緩衝液添加時のセンサーグラムが重ね書きで表示されます。濃縮効果が確認できる最も高い pH 条件で固定化を行います（上記の場合、pH5.0 を採用します）。

補足 3-3. リガンド希釈液の pH の選択方法

濃縮効果が確認できる最も高い pH を、固定化条件として採用します。

前頁結果では、pH4 が最も濃縮効果が高いですが、pH が低いほど、活性型 NHS 基とアミノ基とのカップリング効率は低下します（活性化 NHS 基とアミノ基の至適反応条件は pH8.5)。また、タンパク質の安定性は、一般的に中性に近い程安定です。pH を変化させても、濃縮効果（添加時の傾き）に差がない場合は、pH が高い条件を選択するのが望ましいです。前頁結果では、pH5 を選択します。

なお、**Immobilization pH Scouting** における濃縮レベル以上の固定化は困難です。確認した濃縮レベル（RU）より多くの固定化量を望む場合は、リガンド濃度を上げて（例 100 μg/ml など)、再度 **Immobilization pH Scouting** を実施し濃縮レベルを確認します。

Next>をクリックします。

↓

Save Settings ダイアログが表示されます。

Save をクリックします。

↓

条件検討が終了すると、ワークフローシートの、**Find Immobilization pH** に（　）が入ります。**Overview** にリガンドの調製条件が表示され、**Results reference** で、**Find Immobilization pH** で実行した測定結果ファイルが表示されます。ファイル名をクリックすると、測定結果ファイルを開くことができます。複数のファイルがある場合には、**All results...**をクリックし、ファイルの確認を行います。

3-3. 固定化

固定化の詳細については、Ⅲ-ⅰ.（実験をはじめる前に　B ページ）を参照してください。

Immobilize の [Run] をクリックします。

↓

ワークフローで実施する固定化は、フローセル 1 がリファレンスセル、フローセル 2 がリガンド固定化セルとして設定されています。活性化およびブロッキング時間は 7 分間です。

Next>をクリックします。

↓

Position	Volume (µl)	Content	Type
1	126	Ethanolamine	Immobilization
2	75	ProteinA	Immobilization
3	85	EDC	Mix Fc 2
4	85	NHS	Mix Fc 2
5	Empty	EDC/NHS, min. capacity 130µl	Mix Fc 2
H2O	Full	Deionized water	Water

Rack Positions ダイアログが表示されます。テーブルにしたがい必要サンプルをラックにセットします。

Ethanolamine	126 µl/ 11 mm プラスチックバイアル
Ligand	75 µl/ 11 mm プラスチックバイアル
EDC	85 µl/ 11 mm プラスチックバイアル
NHS	85 µl/ 11 mm プラスチックバイアル
空（NHS / EDC 混合用）	空/ 11 mm プラスチックバイアル

固定化時間・流速を変更した場合には必要量が変わります。

EDC と NHS を自動等量混合するための、空バイアルもセットします。

Next>をクリックします。

↓

確認画面が表示されます。確認後、**Start** をクリックします。

↓

結果の保存先とファイル名を指定後、**Save** をクリックします。測定を緊急停止する場合は、[Ctrl]キーと[Break]キーを同時に押します。

↓

admin @ Biacore X100 Control Software - [Immobilization 10/27/2008 11:56:13 AM]

Fc	Time	Window	AbsResp	SD	LRSD	Slope	RelResp	Baseline	Id
2	261.0	5	20463.4	0.05	0.05	0.01	0.0	Yes	Baseline
2	1018.0	5	20622.5	0.16	0.14	0.06	159.1	No	EDC/NHS
2	1611.0	5	21918.5	0.58	0.11	0.31	1455.1	No	Ligand
2	2132.0	5	21956.4	0.11	0.03	0.06	1493.0	No	Immobilized

Keywords in cycle 1	Value
Chip	CM5
ContactTime	420
FlowRate	5
Ligand	ProteinA
Method	Amine
Procedure	TimeAndFlow

固定化が終了するとシステムは **Standby** 状態になります。測定データは入力したファイル名で自動保存されます。**Immobilization Results** ダイアログが表示されます。

固定化量（Response Bound と Response Final）（RU）が表示されます。

補足 3-4. 固定化量の評価

固定化量として Response Bound と Final の 2 種類が表示されます。Bound は、リガンド添加前後のセンサーグラムの高さの差、Final は、NHS / EDC 添加前からエタノールアミン添加終了後の差です。リガンドがアグリゲーションしている場合やセンサーチップ表面に吸着する場合は、エタノールアミンを添加することにより、非共有結合でセンサーチップ表面に残ったリガンドは洗い流されるため、Final のレスポンスは Bound より小さくなります。また、きわめて固定化量が少ない場合は、NHS 化した部分の大半に（一部はリガンドが導入されています）エタノールアミンが導入されるため、Final のレスポンスは Bound より大きくなることがあります。いずれの場合も、レスポンスが小さい方を固定化量として採用します。

Immobilization Result ダイアログの Close をクリックします。センサーグラム右下の Close をクリックします。

↓

ワークフローシートの、Immobilize に（☑）が入ります。Overview にリガンドの固定化方法、固定化量などが表示されます。Results reference に、固定化の結果ファイルが表示されます。

（リガンド固定化量を、至適固定化量範囲内に抑える場合）
下記の Aim for immobilized level を実行します。ただし、低分子アナライトの場合は、至適固定化量範囲が何千 RU になることがあります。その場合は、34 ページから 36 ページの固定化方法を実施します。
Immobilize の **Run** をクリックします。

↓

ワークフローで実施する固定化は、フローセル 1 がリファレンスセル、フローセル 2 がリガンド固定化セルと設定されています。活性化およびブロッキング時間は 7 分間です。
Next>をクリックします。

↓

Position	Volume (µl)	Content	Type
1	175	ProteinA	Immobilization
2	70	50 mM NaOH	Immobilization
3	126	Ethanolamine	Immobilization
4	85	EDC	Mix Fc 2
5	85	NHS	Mix Fc 2
6	Empty	EDC/NHS, min. capacity 130µl	Mix Fc 2
H2O	Full	Deionized water	Water

Rack Positions ダイアログが表示されます。テーブルにしたがい必要サンプルをラックにセットします。

Ligand	175 µl/ 11 mm プラスチックバイアル
50 mM NaOH	70 µl/ 11 mm プラスチックバイアル
Ethanolamine	126 µl/ 11 mm プラスチックバイアル
EDC	85 µl/ 11 mm プラスチックバイアル
NHS	85 µl/ 11 mm プラスチックバイアル
空（NHS / EDC 混合用）	空/ 11 mm プラスチックバイアル

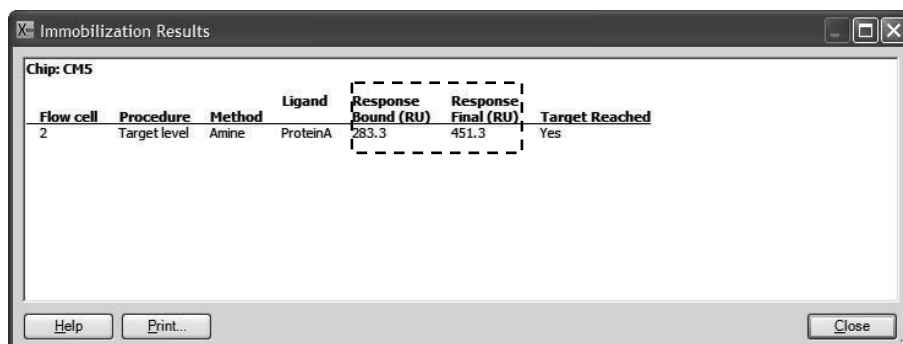
流速を変更した場合には必要量が変わります。

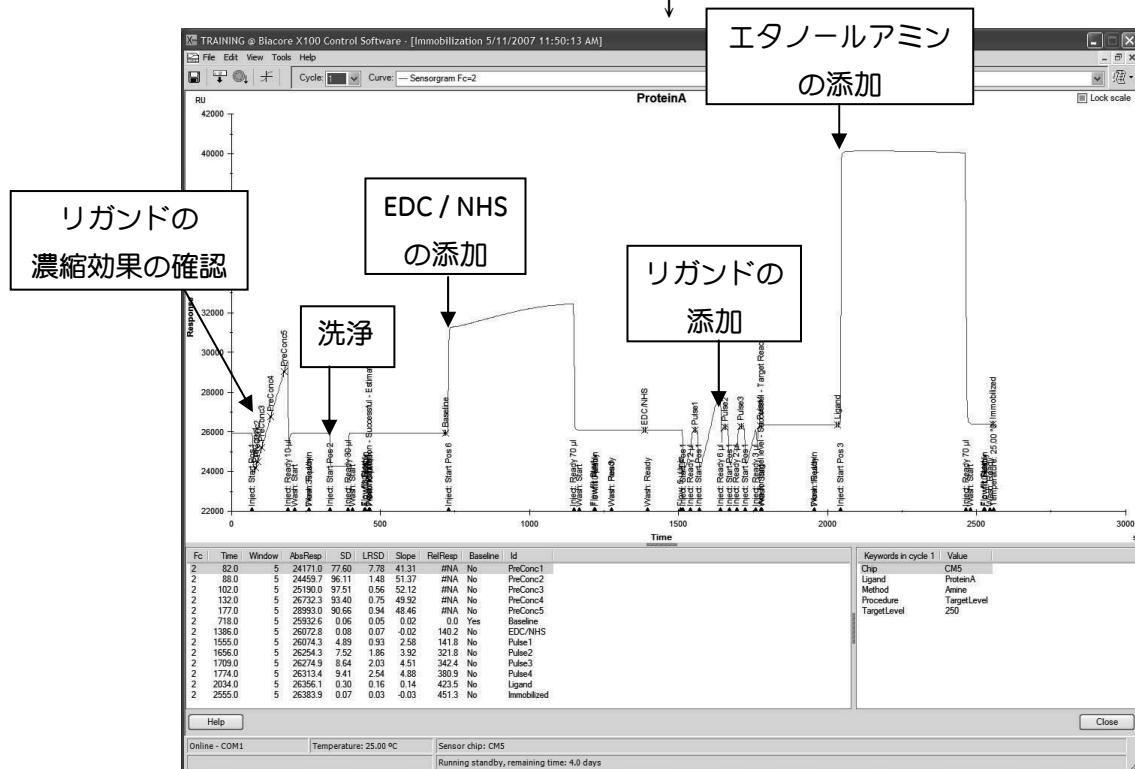
EDC と NHS を自動等量混合するための、空バイアルもセットします。

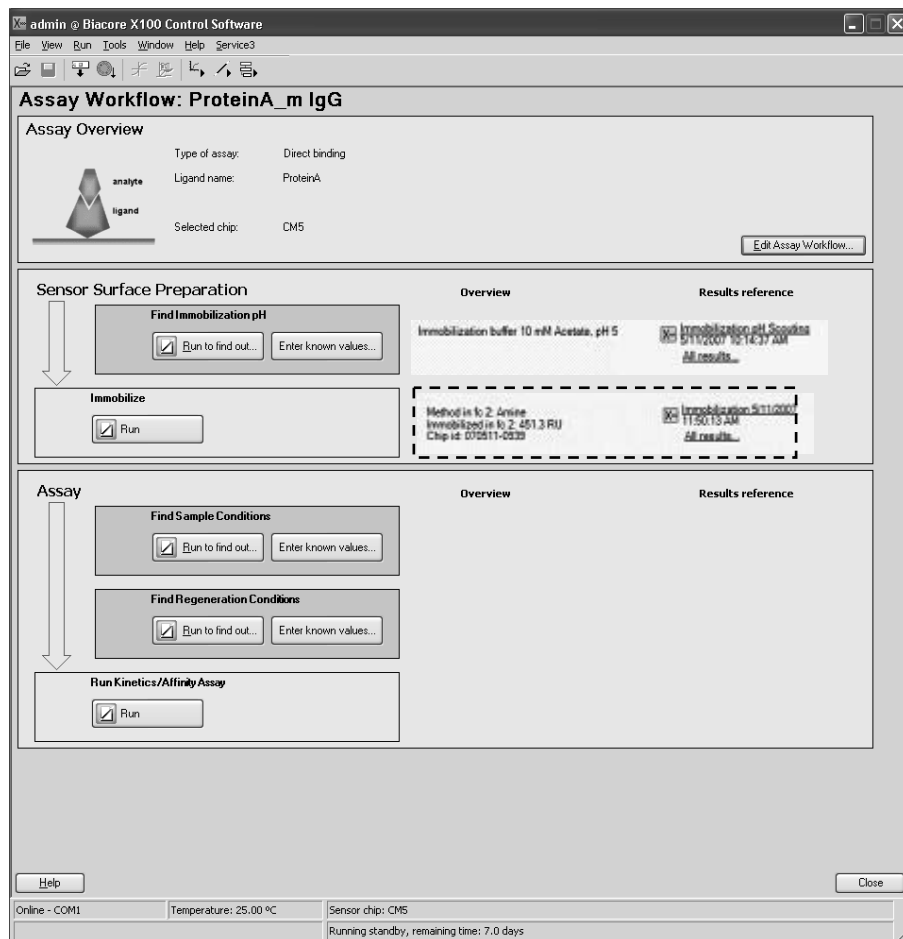
Next>をクリックします。

↓

確認画面が表示されます。確認後、Start をクリックします。

↓

結果の保存先とファイル名を指定後、Save をクリックします。**測定を緊急停止する場合は、[Ctrl]キーと[Break]キーを同時に押します。**

↓

※　**Aim for immobilized level** を選択すると、固定化の前に、リガンドの濃縮効果の確認とチップ表面の洗浄を行います。

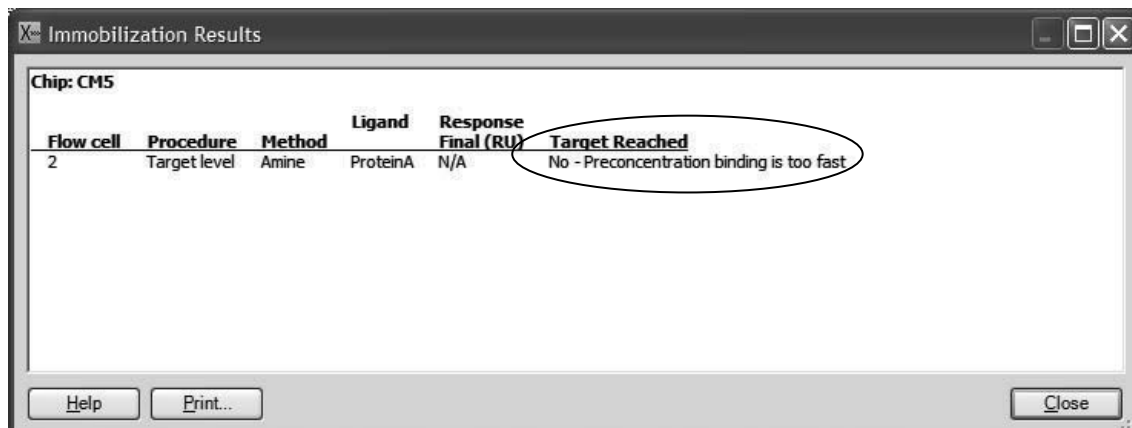
固定化が終了すると、システムは **Standby** 状態になります。**Standby** の終了方法は、2-1-4.（22 ページ）を参照してください。**Immobilization Results** ダイアログが表示されます。

固定化量（**Response Bound** と **Response Final**）（RU）が表示されます。固定化量の評価については、補足 3-4.（36 ページ）を参照してください。

↓

Immobilization Result ダイアログの **Close** をクリックします。センサーグラム右下の **Close** をクリックします。

ワークフローシートの、**Immobilize** に（ ☑ ）が入ります。**Overview** にリガンドの固定化方法、固定化量などが表示されます。**Results reference** に、固定化の結果ファイルが表示されます。

補足 3-5. 固定化実行中の中断

Aim for immobilized level を実行すると、NHS 活性化前に、リガンド溶液をフローセルにテスト添加します。濃縮効果が得られるかどうか、その結果から目的の固定化量に調製できるリガンド溶液の状態であるかを判断します。
セットしたリガンド溶液に問題がある場合には、この時点でプログラムが自動的に終了します。この場合、フローセルにはリガンドは固定化されていないので、リガンド溶液を調製し直して、同じフローセルに再度固定化を試みます。

・濃縮効果が強すぎる場合　（Preconcentration binding is too fast）
テスト添加において濃縮効果が強すぎて、添加時間を短くしても目標のレベル以上に固定化されてしまうと判断された場合は、Target Reached に Preconcentration binding is too fast とメッセージが表示され、固定化操作が中断されます。

この場合には、希釈緩衝液の pH を上げるか、リガンド濃度を下げることにより、濃縮量を下げて再度固定化し直します。

・濃縮効果が不十分な場合　（Preconcentration binding is too slow）
テスト添加においてリガンド溶液の濃縮効果が観察されなかった場合、もしくはあまりにも濃縮がゆるやかなため、添加時間を長くしても目標のレベルまで固定化できそうもないと判断された場合は、Target Reached に Preconcentration binding is too slow のメッセージが表示され、固定化が中断されます。

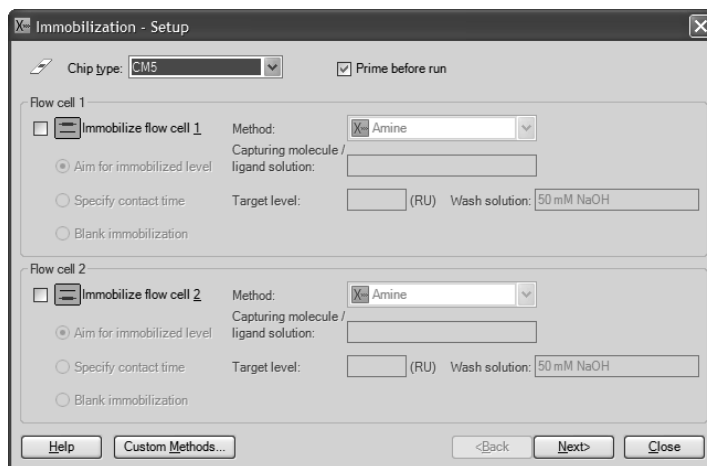
この場合には、希釈緩衝液の pH を下げるか、リガンド濃度を上げることにより、濃縮量を上げて再度固定化し直します。

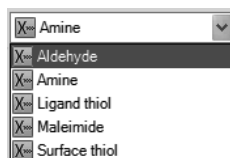
補足 3-6. 固定化テンプレートの変更

固定化の流速や活性化時間の変更を行う際や、フローセル 1 への固定化やブロッキングを行うときには、ワークフローを閉じ、 **Wizards...** → **Immobilization** を実行します。

Other options の（ ）をクリックします。

Wizards... → **Immobilization** をクリックします。**New** をクリックします。

↓

Chip type を選択し、固定化を行うフローセルを選択します。

Method:のプルダウンメニューをクリックして選択します。

リガンド添加方法を選択します。

○Aim for immobilized level　　Target level に目標固定化量を入力します。自動で固定化量を調製します。

　　Wash solution:　　固定化前に実施する濃縮効果確認後の、チップ表面の洗浄溶液を指定します。通常は、50 mM NaOH を指定します（固定化前の洗浄なので、リガンドへの影響はありません）。

○Specify contact time　　入力した時間リガンドを添加します。

○Blank immobilization　　活性化・ブロッキングのみ行います。

↓

Next>をクリックします。

↓

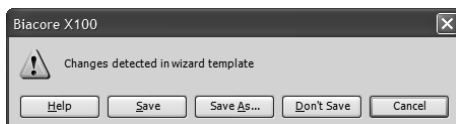
Rack Position ダイアログが表示されます。テーブルにしたがいサンプルをラックにセットします。Next>をクリックします。

↓

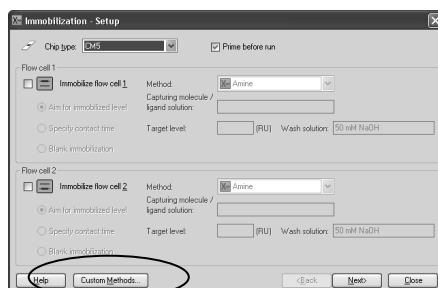
確認後、Start をクリックします。

↓

作成したテンプレートを保存する場合は、Save As...で名前をつけて保存を行います。保存しない場合は、Don't Save をクリックします。

↓

結果の保存先とファイル名を指定後、Save をクリックします。測定を緊急停止する場合は、[Ctrl]キーと[Break]キーを同時に押します。

↓

測定が終了すると、システムは Standby 状態になります。

メソッドの変更とコマンドの追加

① メソッドの変更

Setup ダイアログの Custom Methods...をクリックします。

↓

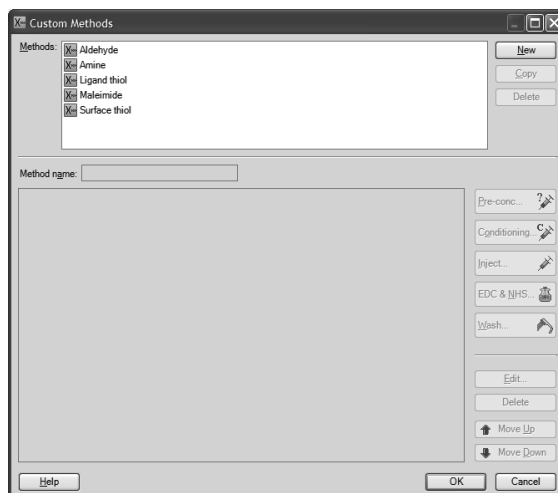
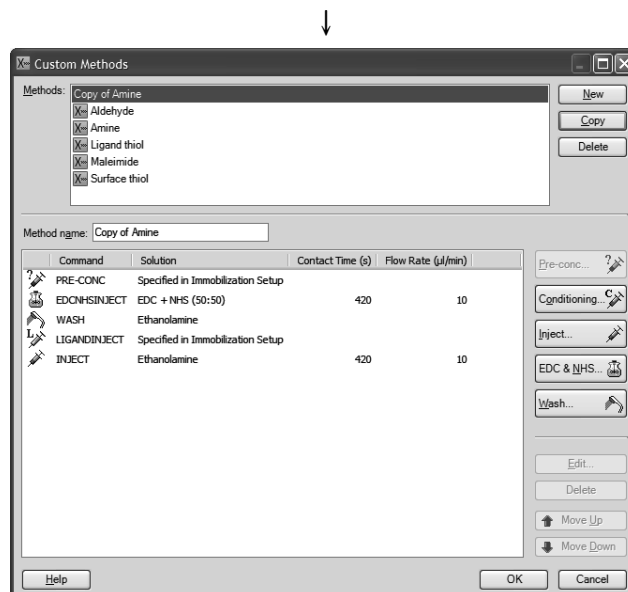
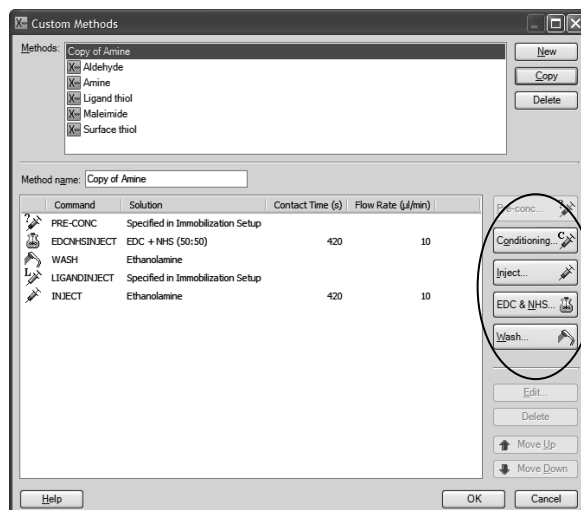
Methods:の各種固定化方法をクリックすると、テンプレートの固定化詳細が確認できます。テンプレートの固定化条件を変更する際は、固定化方法を選択した状態で、Copy をクリックします。

↓

Method に追加されます。Method name で名前の変更が可能です。
コマンドをダブルクリックまたは選択後 Edit...をクリックすると、各種設定の変更が可能です。

② コマンドの追加

ダイアログ右下のアイコンを選択して、コマンドを指定します。
OK をクリックします。

↓

変更および追加したメソッドは、Set up ダイアログの Method：で選択可能となります。

3-4. 相互作用測定

3-4-1. マルチサイクル法による測定

マルチサイクル法の場合、サイクル毎にアナライトを解離させます。解離が速い場合は、完全に落ちるまで解離時間を長く設定し、解離が遅い場合は、再生操作を実施します。

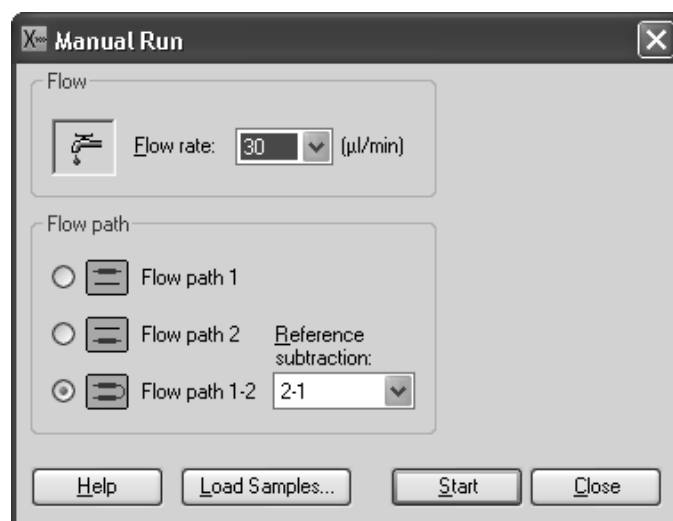
3-4-1-1. 特異的結合の確認および再生条件の検討

特異的結合の確認および再生条件の検討は、マニュアル測定でも、ワークフローからウィザードを使用した測定でも、両方対応できます。どちらかの測定方法を選択して条件検討を行います。

＜マニュアル測定による条件検討＞

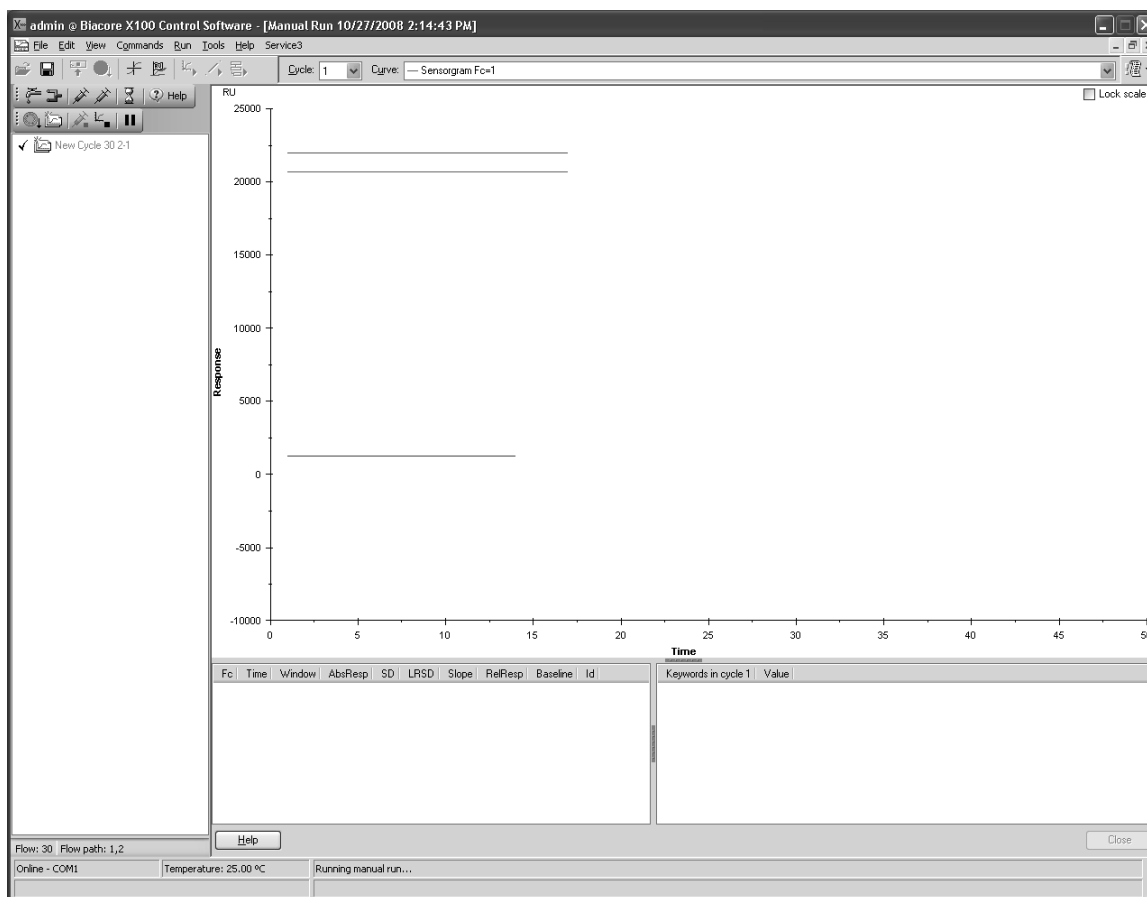
ワークフローを一旦閉じます。

Other options の をクリックし、**Manual Run...** をクリックします。

↓

流速は 30 µl/min、Flow path は 1-2、Reference subtraction は 2-1 を設定します。測定前にサンプルをセットする場合は、Load Samples...をクリックし、サンプルラックのロックを解除します。ラックにサンプルをセットし、装置に戻して、再びロックします。

Start をクリックします。

↓

ファイル名を入力し、**Save** をクリックします。

フローセル 1 は赤、フローセル 2 は緑、2-1 の差し引きは茶色のセンサーグラムで表示されます。

補足 3-7. センサーグラムの表示の変更

・1 本表示

View → Show Only Current Curve

右上のカーブリストから、表示するセンサーグラムを選択します。

・全表示

View → Show All Curves

すべてのセンサーグラムが表示されます。

・種別表示

View → Show Curves of Same Type

カーブリストから、各フローセルのセンサーグラムまたは差し引きセンサーグラムを選択します。

補足 3-8. コマンドの説明

；流速の選択（流速 5、10、30 µl/min から選択）

；流路の切り替え（Detection1,2 に設定している場合利用可能）

；サンプル添加　（赤いシリンジ）

；再生溶液添加　（青いシリンジ）

；待機（次の操作コマンドを実行するまでの時間を任意で設定できます）

；ヘルプボタン（Support Navigator を表示）

；サンプルラックの取り出し

；サイクルの切り替え。センサーグラムを新たにスタートします。

；添加の中止（サンプルおよび再生溶液添加時に実行可能）

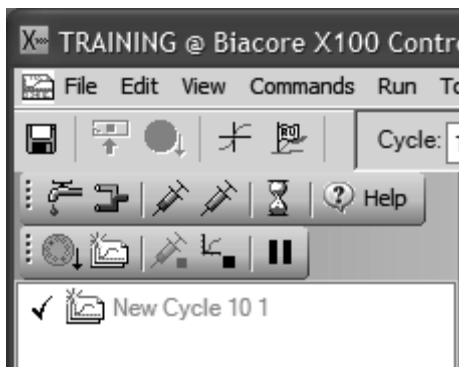
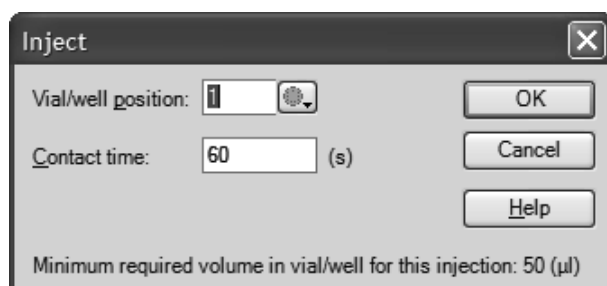
；測定の終了（すべてのコマンドの実行後に、Standby 状態に入ります）

；一時停止（予約コマンドの一時停止が可能）

；再スタート（一時停止の解除）

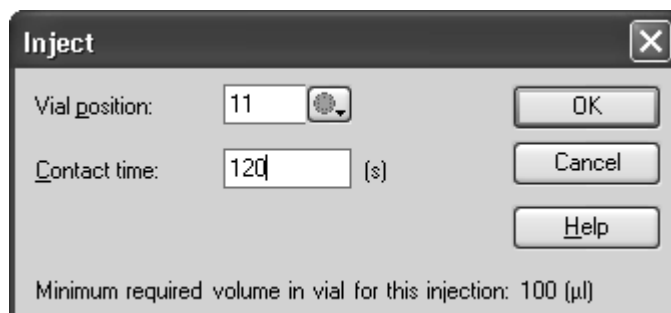
コマンドは、コマンドテーブルに任意で追加が可能です。追加されたコマンドは、上から順番に実行されます。実行中のコマンドは、　がつきます。実行が終了したコマンドは、✓ がつきます。

アナライトの添加

画面左上のアイコンを選択して、測定コマンドを指定します（各コマンドの説明は補足 3-8. 46 ページを参照してください。または、 Help をクリックしサポートナビゲーターを参照してください）。

Injection command をクリックします。

↓

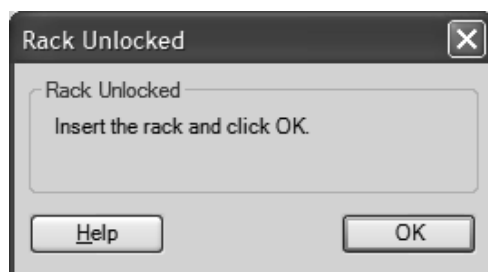
Vial/well position:の をクリックし、アナライトをセットした位置にマウスを移動しクリックします。

↓

Contact time:にアナライト添加時間（通常 60 秒～120 秒）を入力すると、必要量がダイアログ下部に表示されます。相互作用測定の条件検討の詳細は、Ⅳ-ⅰ.（実験をはじめる前に　G ページ）を参照してください。

OK をクリックします。

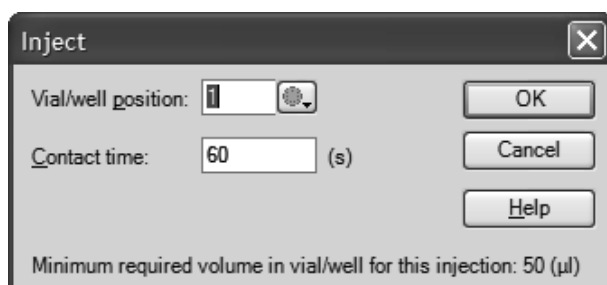
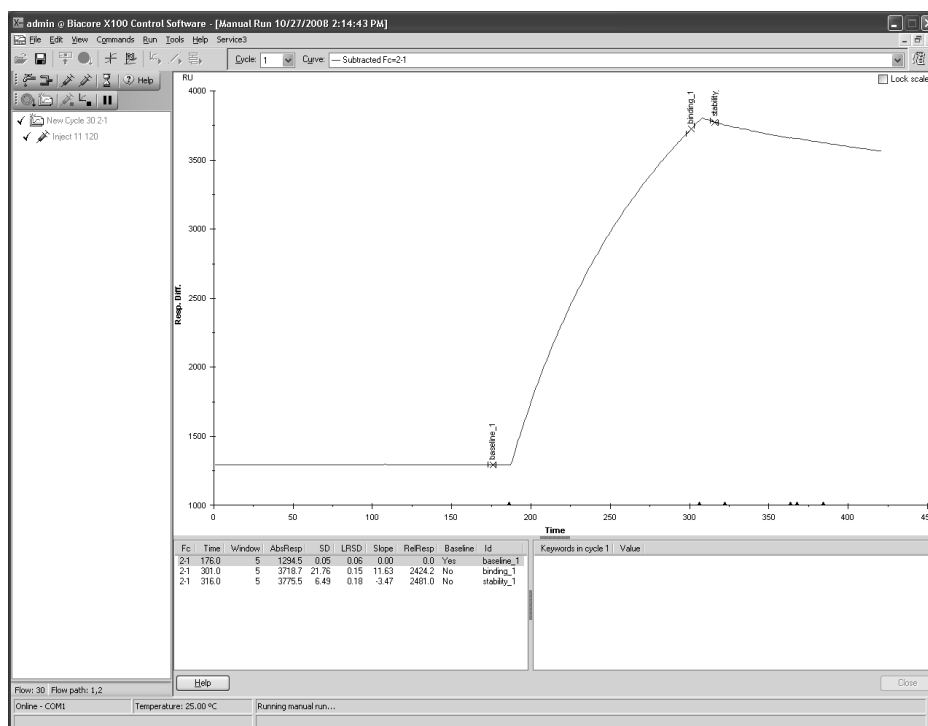
（測定を開始した後に、アナライトをラックにセットする場合は、一旦、**Cancel** をクリックし、**Inject** ダイアログを解除します。）

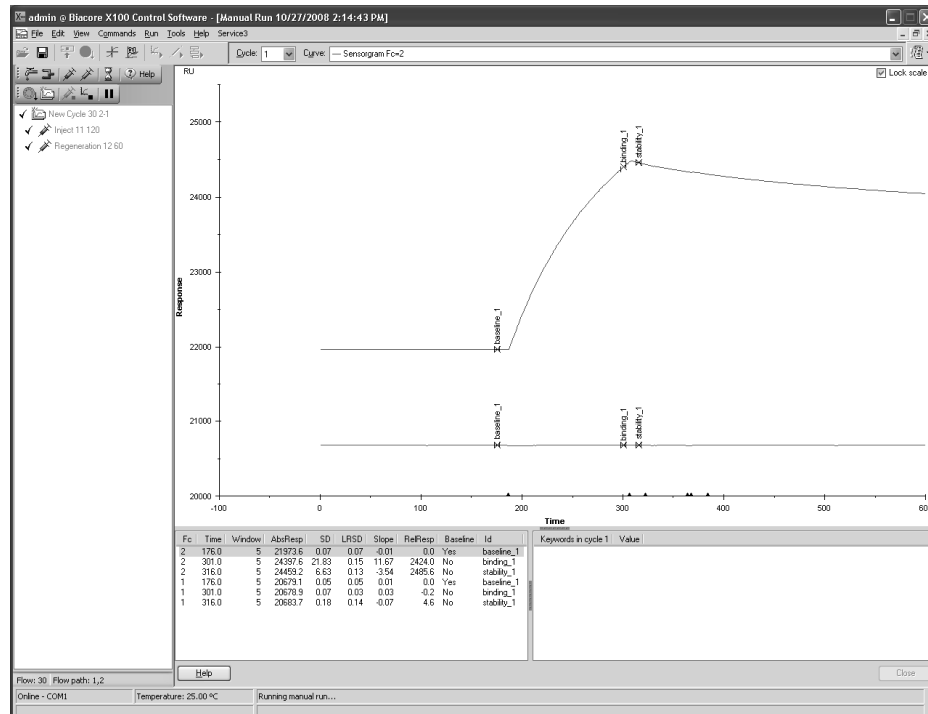
↓

Load Samples アイコン を選択します。

ラックを取り出し、必要量分注したアナライトをセットします。
ラックを再びシステムにセットし、OK をクリックします。再び、**Injection command** をクリックします。

↓

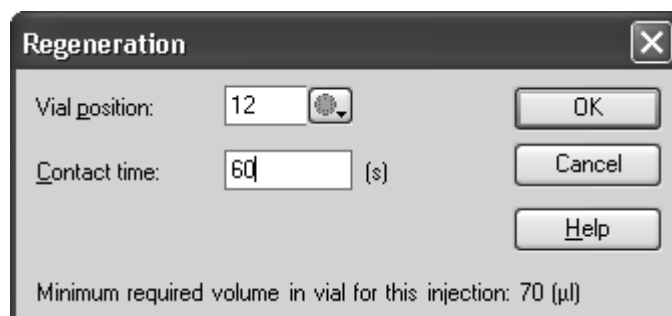
アナライトをセットした位置および添加時間（秒）を入力します。

↓

Fc=2-1 の差し引きのセンサーグラムを表示させます。特異的結合が見られれば、サンプル添加後のセンサーグラムは上昇します。

↓

Fc=1 のセンサーグラムを確認します。非特異的吸着があれば、サンプル添加後のセンサーグラムは上昇します。

再生条件の検討

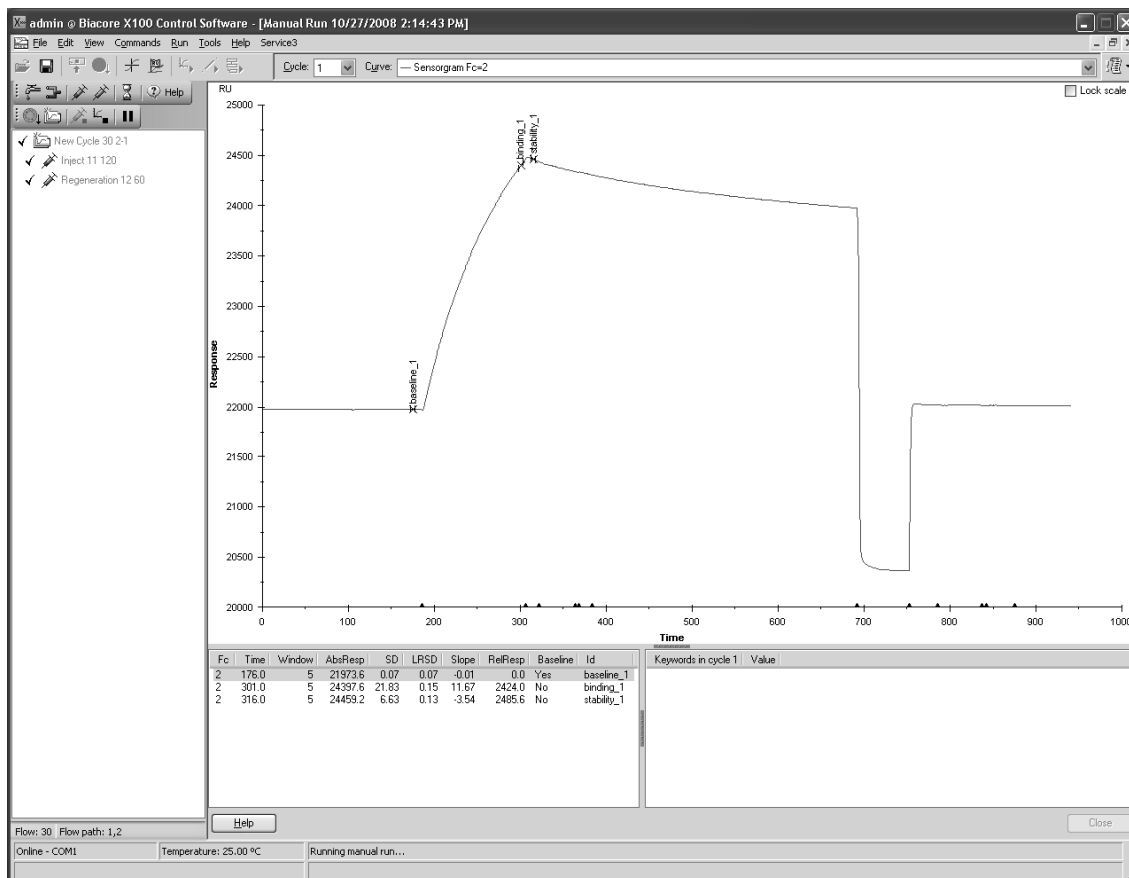
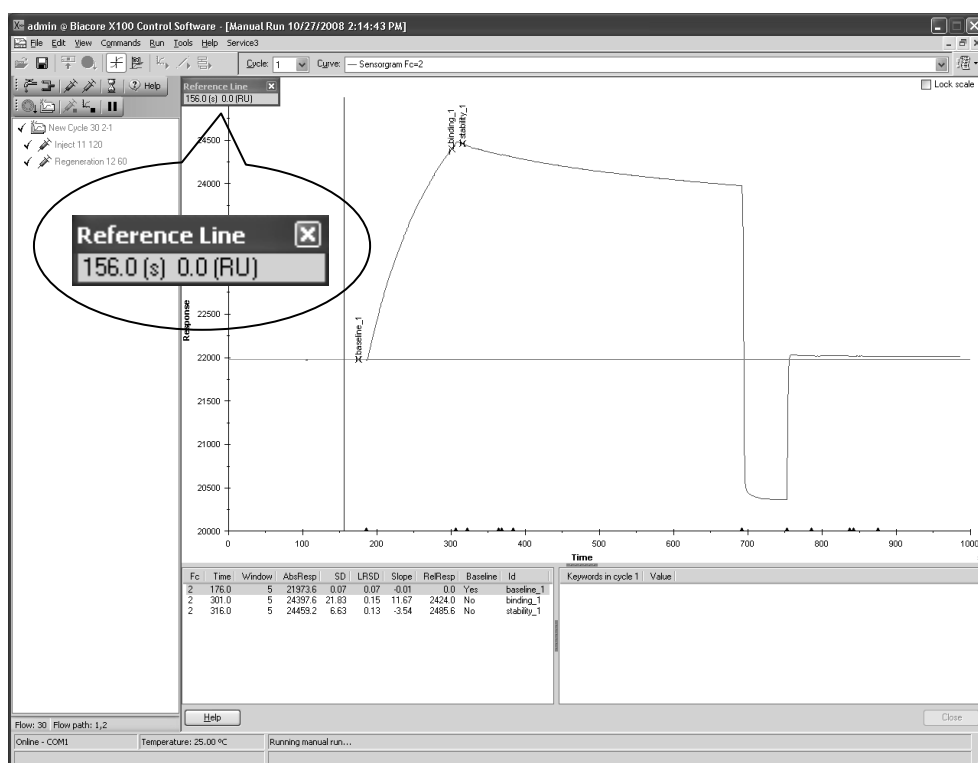
再生溶液の種類、添加時間については、Ⅳ-ⅰ.（実験をはじめる前に　H ページ）を参照してください。

再生溶液を添加する際は、**Regeneration Command...** をクリックします。

再生溶液のセット位置を選択、添加時間（s）を入力し、**OK** をクリックします。

↓

（再生溶液添加後の結合量の確認）

View → **Reference Line** をクリックします。

↓

リファレンスラインの縦軸を、左ボタンのクリック＆ドラッグでアナライト添加前に移動させ、**View** → **Baseline** をクリックします。リファレンスラインウィンドウの RU が 0 になります。

↓

再生溶液添加後に、リファレンスラインの縦軸を左ボタンのクリック＆ドラッグで移動し、再生後のアナライト残存量を確認します。

新規サイクルへの変更

New Cycle...アイコン（　）もしくは、メニューバーの **Commands** → **New Cycle...**をクリックします。

流速、Flow path の設定を確認後、**OK** をクリックします。
測定サイクルが切り替わります。

測定の終了

End manual run アイコン　またはメニューバーの **Run** → **Stop Run...**をクリックします。

OK をクリックします。指定したコマンドをすべて実行した後に、**Standby** 状態になります。

＜ウィザード測定による条件検討＞

<u>アナライトの添加条件の検討</u>

ワークフローシートの Find Sample Conditions → Run to find out...をクリックします（すでに条件が決まっている場合には、Enter known values...をクリックして、条件を入力します）。

↓

Next>をクリックします。

↓

Prime before run　　　測定前に **Prime** を実行する場合は、チェックします。

Next>をクリックします。

↓

Next>をクリックします。

↓

Rack Positions ダイアログが表示されます。テーブルにしたがいアナライトをラックにセットします。**Next>**をクリックします。

↓

確認画面が表示されます。確認後、**Start** をクリックします。

↓

結果の保存先とファイル名を指定後、**Save** をクリックします。測定を中断する場合は、補足 3-2.（30 ページ）を参照します。

↓

↓

Fc	Name	Sample name	Conc. (µg/ml)	RelResp (RU)
1	binding	mouse IgG	0.002	-4.4
1	stability	mouse IgG		0.6
1	binding_2	mouse IgG	0.02	-4.9
1	stability_2	mouse IgG		-0.4
1	binding_3	mouse IgG	0.2	-5.1
1	stability_3	mouse IgG		-0.5
1	binding_4	mouse IgG	2	-5.9

測定が終了後、**Results** ダイアログが表示されます。システムは **Standby** 状態になります。
レポートポイントテーブルで結合量の確認を行います。
Next>をクリックします。

↓

Save Settings ダイアログが表示されます。
測定結果を考慮し、添加時間、解離時間、最大濃度、再生の必要性を決定します。
Save をクリックします。

↓

ワークフローシートの、**Assay** → **Find Sample Conditions** の **Run to find out...**に（ ）が入ります。**Overview** にアナライト添加時間と解離時間、最大濃度などが表示されます。

<u>再生条件の検討</u>

Find Regeneration Conditions → Run to find out...をクリックします（すでに条件が決まっている場合は、Enter known values...をクリックして、条件を入力します）。

↓

Next>をクリックします。

↓

Prime before run　　測定前に Prime を実行する場合は、チェックを入れます。

Next>をクリックします。

↓

Injection Parameters ダイアログが表示されます。

サンプルの各項目は、Find Sample Conditions で保存した条件が自動入力されます。

（変更を行う場合は、Find Sample Conditions の Enter known values...をクリックして、条件を入力します）

Next>をクリックします。

↓

Experimental Parameters ダイアログが表示されます。

Regeneration parameters・・・

Stabilization period:　アナライト添加前のベースラインの安定化時間（秒）

Experimental design・・・

Lock:　Solutions のみにチェックを入れると、1 種類の再生溶液について、添加時間を変更した検討が可能。
Contact time のみにチェックを入れると、複数種類の再生溶液について、一定の添加時間で検討が可能。
Solutions および Contact time のチェックを入れると、1 種類の再生溶液について、一定の添加時間で検討。
Solutions および Contact time のチェックを外すと、再生溶液の種類および添加時間を個別に検討可能。

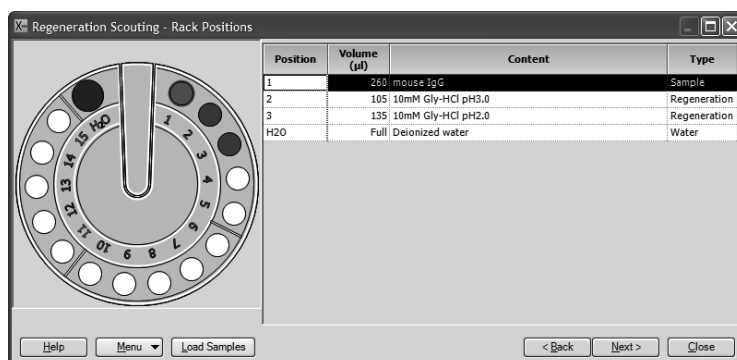
Number of conditions:　再生溶液の種類の数を選択します。7 種類まで選択可能。

Number of cycles for each conditions:
各再生溶液を用いた相互作用測定のくり返しサイクル数。5 サイクルまで選択可能。

Settings・・・

Regeneration solution　再生溶液名

Contact time(s)　再生溶液添加時間（秒）

再生溶液を 2 回添加する場合には、Regeneration solution1 および 2、Contact time 1 および 2 のカラムが表示されます。

Next>をクリックします。

↓

Rack Positions ダイアログが表示されます。テーブルにしたがいサンプルをラックにセットします。Next>をクリックします。

↓

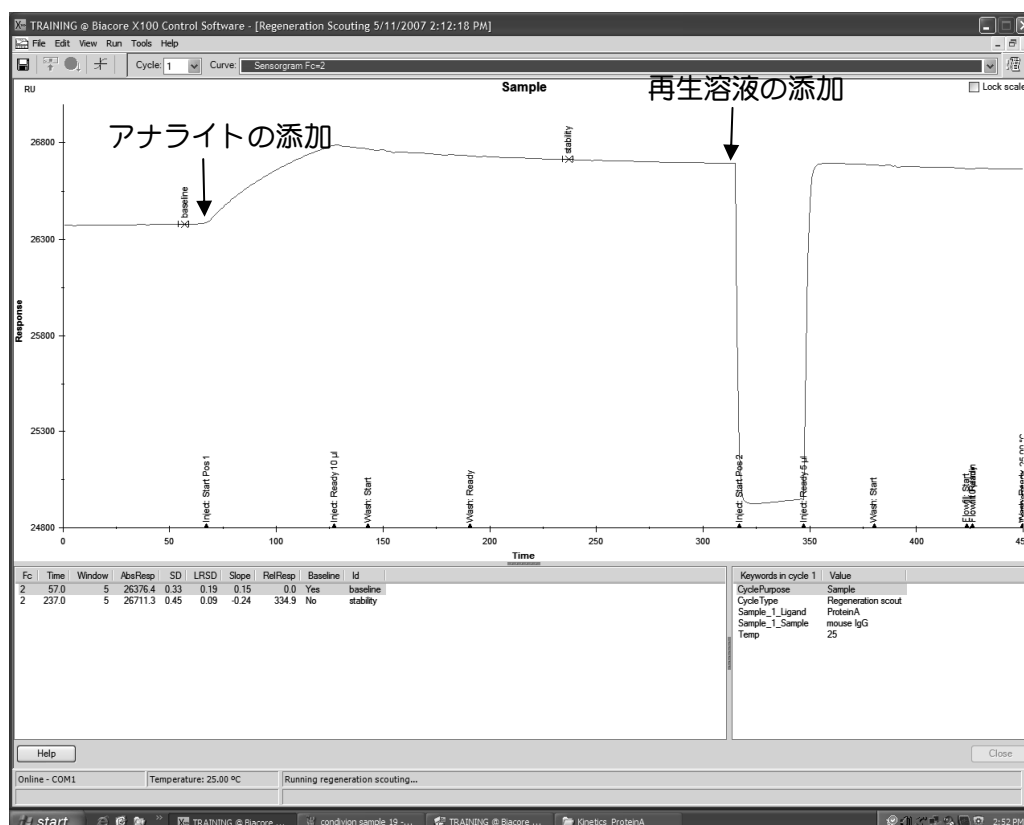
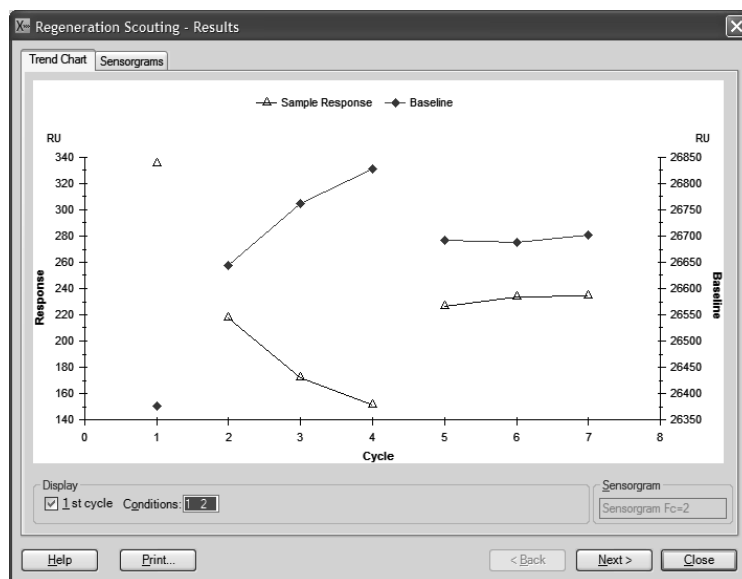
確認画面が表示されます。確認後、Start をクリックします。

↓

結果の保存先とファイル名を指定後、Save をクリックします。測定を中断する場合は、補足 3-2.（30 ページ）を参照してください。

↓

アナライト添加と再生溶液添加を 1 サイクルとして、指定したサイクル数実行します。

↓

測定が終了後、**Result** ダイアログが表示されます。システムは **Standby** 状態になります。

●**Trend Chart** タブ

Sample Response	アナライトの結合量のプロット
Baseline	アナライト添加前のベースラインのプロット
Display・・・	1st cycle のチェックを外すと、1 サイクル目のデータが消えます。
Conditions:	結果の抽出が行えます。

評価方法；
横軸は、サイクルナンバー、左の縦軸は、"Sample Response"（アナライトの結合量）、右の縦軸は"Baseline"（ベースラインの高さ）の RU を表しています。1 サイクル目の Sample Response と Baseline の高さは、再生条件を検討する前の値です。上記結果は、2 サイクル目から 4 サイクル目が、1 つめの再生条件の検討結果を表しています。Baseline プロットが右肩上がりで、Sample Response プロットが右肩下がりになっていることから、アナライトの結合が完全に解離していない様子を表します。5 サイクル目から 7 サイクル目が、2 つめの再生条件を検討した結果です。Sample Response プロットも Baseline プロットも、5 サイクル目のレスポンスが、2 サイクル目のレスポンスと同様の値であり、7 サイクル目まで安定してプロットされていることから、結合したアナライトが解離し、かつ再現性よく結合が見られていることを示します。よって、2 つめに検討した再生条件が至適条件と言えます。

●Sensorgrams タブ

Display・・・　選択しているセンサーグラムの重ね書きが表示されます。

Cycles:　測定サイクルの抽出が行えます。

適当な再生条件が見つかれば、**Next>**をクリックします。

（適当な再生条件が見つからない場合は、**Close** をクリックし、再度、再生条件について検討しなおします。）

↓

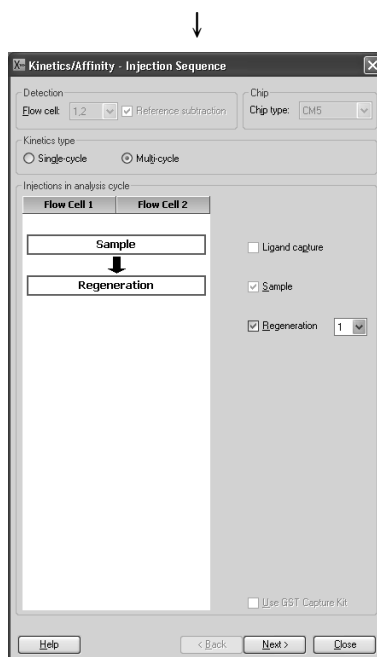
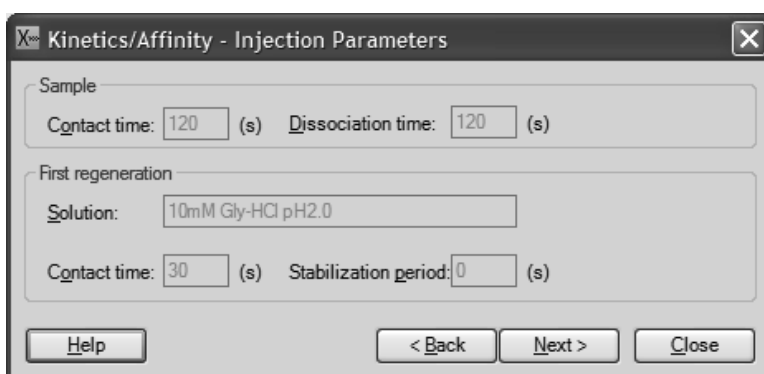
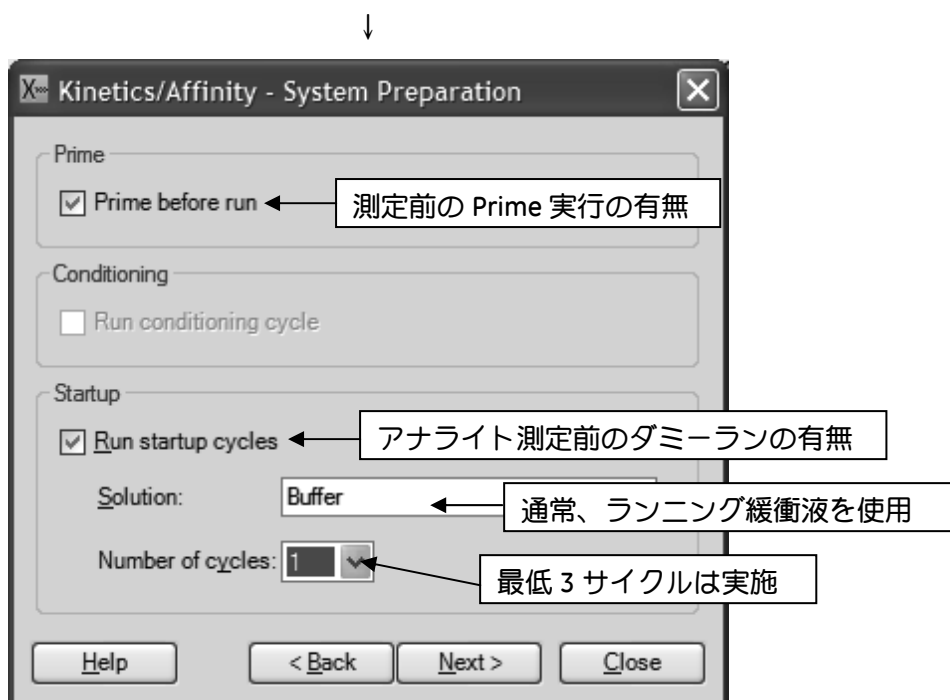
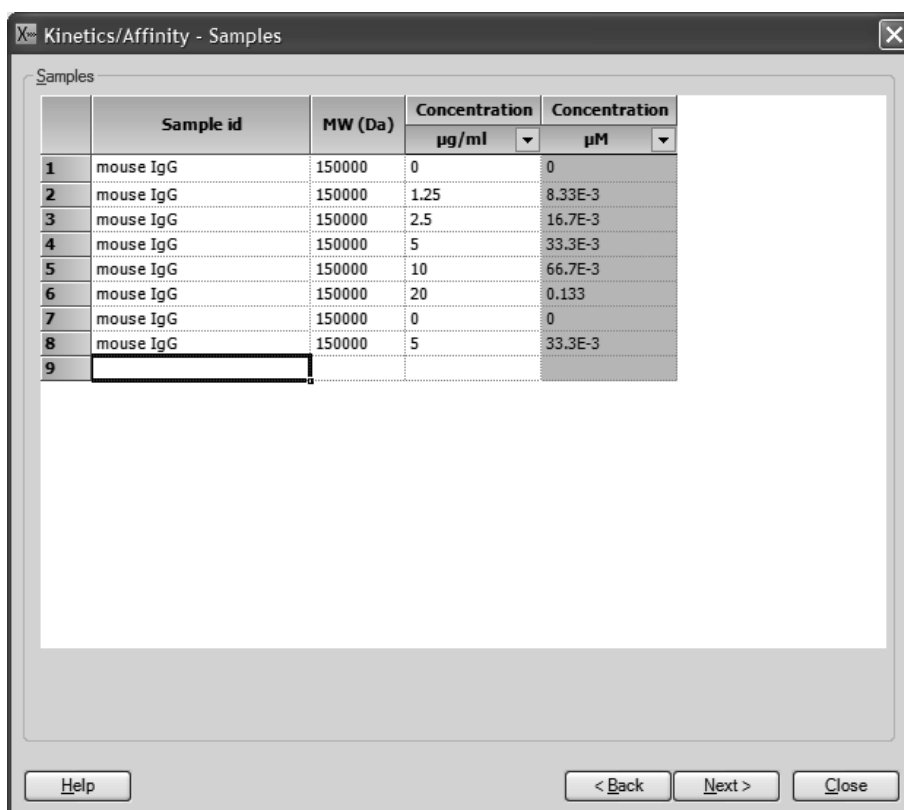
Save をクリックします。保存条件が最終測定プログラムに反映されます。

↓

ワークフローシートの、Assay → Find Regeneration Conditions の Run to find out...に（　）が入ります。Overview に再生溶液名、添加時間などが表示されます。

3-4-1-2. 測定

Run Kinetics/Affinity Assay → Run をクリックします。

↓

Injection Sequence ダイアログが表示されます。Kinetics type で、Multi-cycle を選択します。
リガンドキャプチャーの有無、再生溶液添加回数を決定します。
Next>をクリックします。

↓

Next>をクリックします。

↓

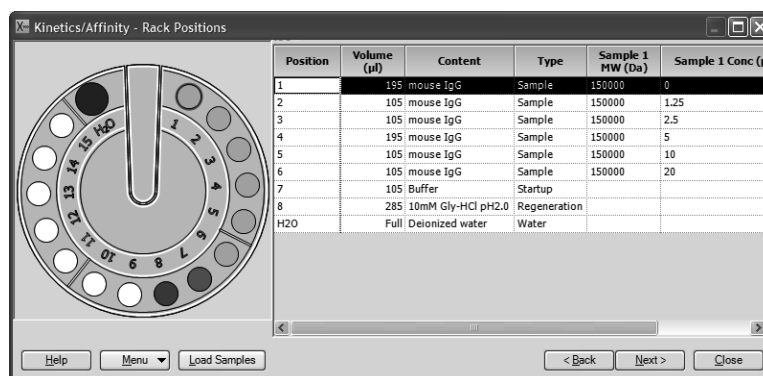
Injection Parameters ダイアログが表示されます。ワークフローで決定した条件が自動入力されています。この画面での変更は不可能です。

Next>をクリックします。

↓

	Sample id	MW (Da)	Concentration µg/ml	Concentration µM
1	mouse IgG	150000	0	0
2	mouse IgG	150000	1.25	8.33E-3
3	mouse IgG	150000	2.5	16.7E-3
4	mouse IgG	150000	5	33.3E-3
5	mouse IgG	150000	10	66.7E-3
6	mouse IgG	150000	20	0.133
7	mouse IgG	150000	0	0
8	mouse IgG	150000	5	33.3E-3
9				

Sample ダイアログが表示されます。**Sample id** および **Concentration** は、ワークフローで検討した情報が自動入力されます。アナライト濃度は、最大濃度から 2 倍希釈系列で 5 点と、ゼロ濃度を 2 点、濃度系列の中 1 点を 2 回測定する設定となっています。必要に応じて変更可能です。単位の変更は をクリックします。詳細は、Ⅳ-ⅱ.（実験をはじめる前に　Ⅰページ）を参照してください。

Samples のテーブルの **MW(Da)**に、アナライト分子量(Da)を入力します。

↓

Rack Positions ダイアログが表示されます。テーブルにしたがいサンプルをラックにセットします。**Next>**をクリックします。

↓

確認画面が表示されます。確認後、**Start** をクリックします。

↓

結果の保存先とファイル名を指定後、**Save** をクリックします。測定を中断する場合は、補足 3-2.（30 ページ）を参照してください。

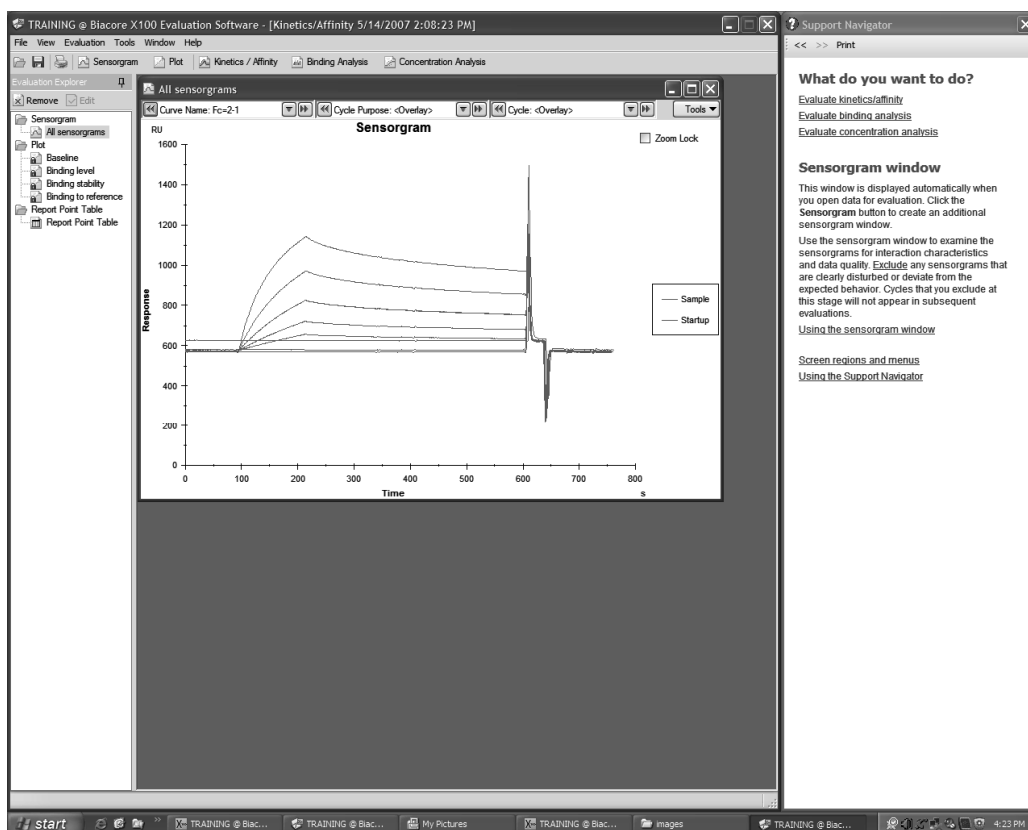
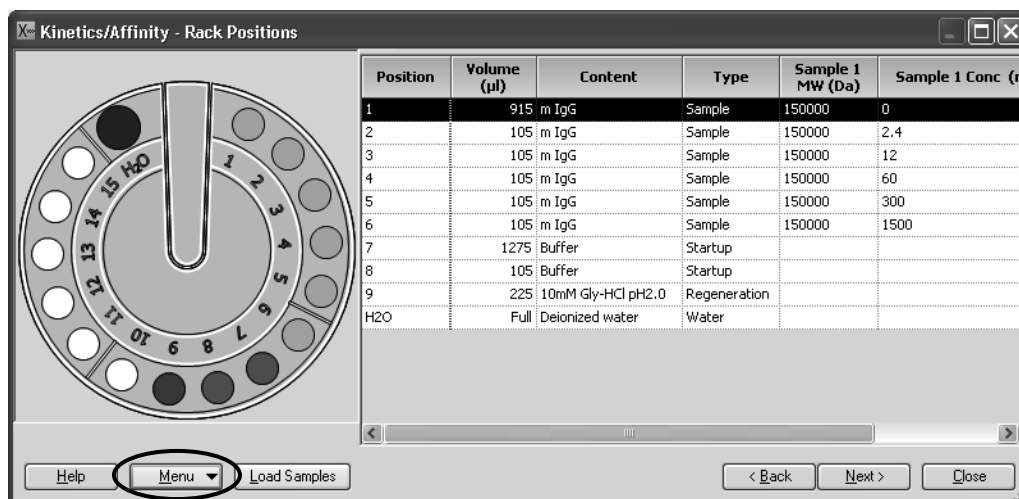
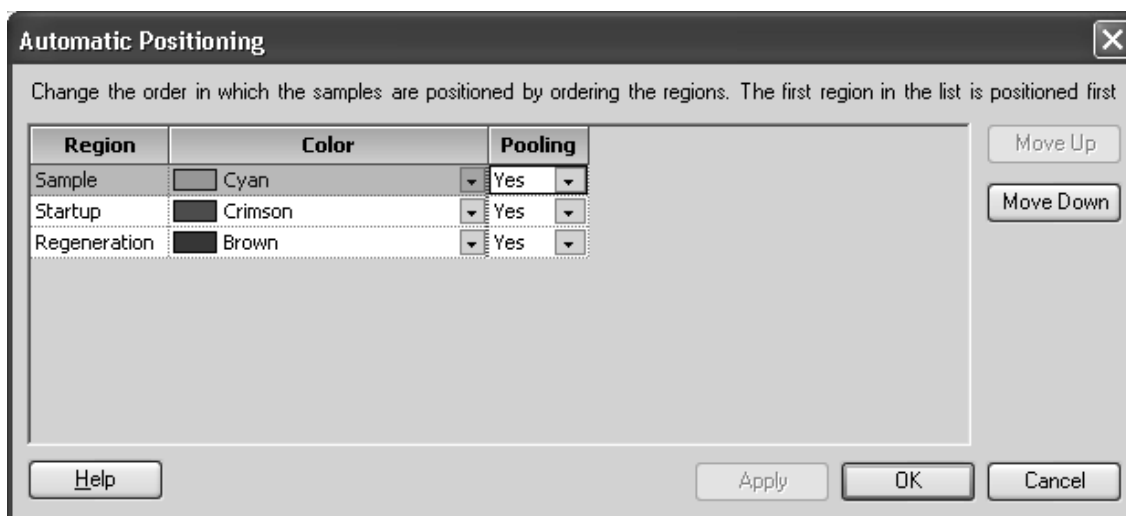
↓

測定が終了すると、システムは **Standby** 状態になります。**Standby** の終了方法は、2-1-4.（22 ページ）を参照してください。取得データは自動保存され、Biacore X100 Evaluation Software が立ち上がり、取得データが開きます。

補足 3-9. サンプリング設定

サンプル位置は、同一サンプルの場合、同一バイアルに設定されており、添加回数分の量が設定されています。サンプリング設定を変更したい場合は、プーリング機能の設定を変更します。

Menu から Automatic Positioning...を選びます。

↓

"Pooling"の項目は、通常、Yes になっています。

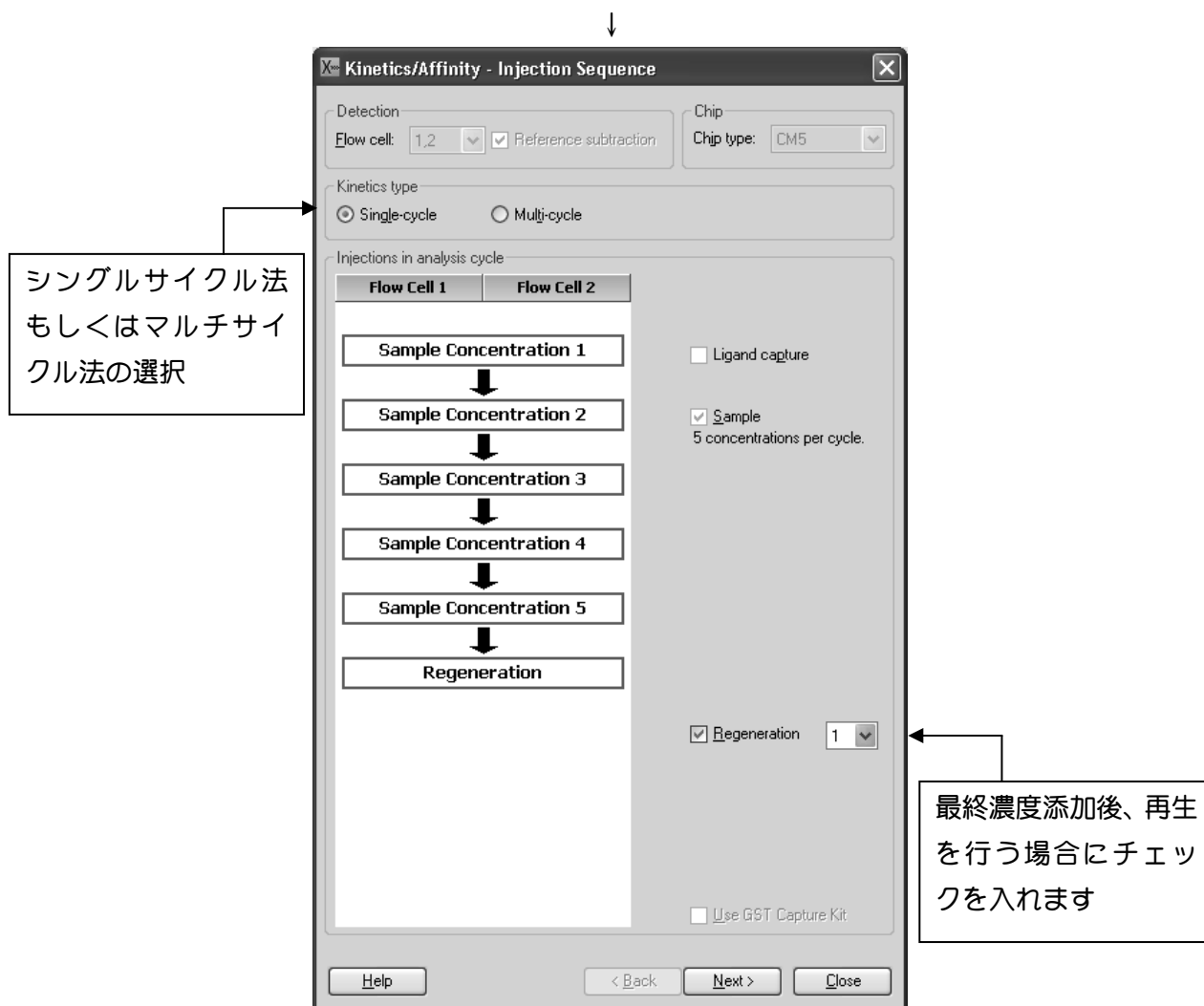
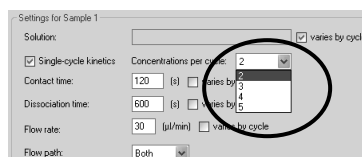
添加回数分、分注して配置したい場合は、"Pooling"のプルダウンメニューから No を選択し、ダイアログ右下の OK をクリックします。

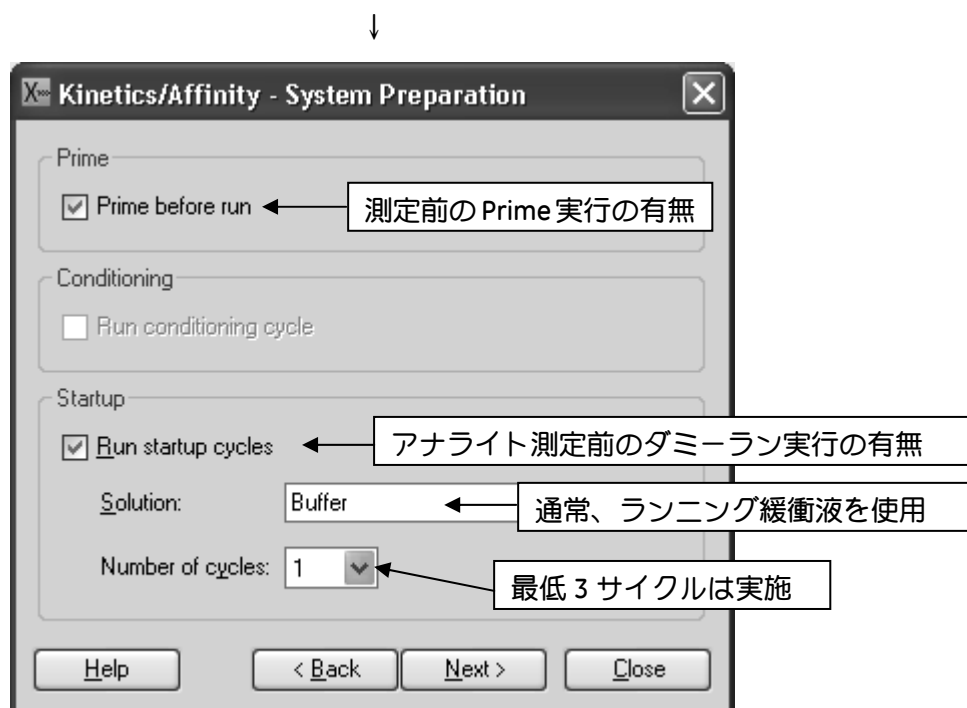
3-4-2. シングルサイクル法による測定

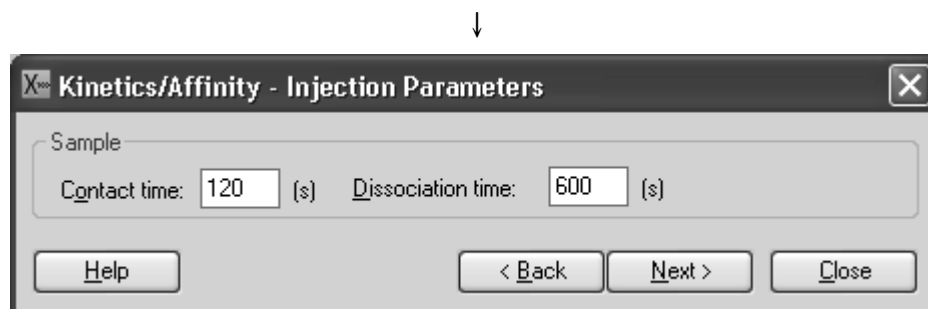
シングルサイクル法の詳細については、Ⅳ- ii （実験をはじめる前に　I ページ）を参照してください。
Run Kineteics/Affinity Assay の をクリックします。

↓

シングルサイクル法もしくはマルチサイクル法の選択

最終濃度添加後、再生を行う場合にチェックを入れます

アナライトを連続 5 回添加します（ワークフローモードでシングルサイクル法を実施する場合は、アナライト添加回数は 5 回で変更ができません。Wizard を用いる場合は、添加回数を 2～5 回まで選択可能です）。

最終濃度を添加した後、リガンドを再生したい場合は（再生の詳細はⅣ- i （実験をはじめる前に　H ページ）を参照してください）、Regeneration にチェックを入れ、回数を決定します。

↓

Next>をクリックします。

↓

アナライトの添加時間、解離時間を入力します。

※　ここで入力する解離時間は、最終濃度の添加後を指します。添加の間の解離時間は、添加終了後の洗浄、次の添加の準備の時間として、プログラム上決められています。

Next>をクリックします。

↓

Sample id:　アナライト名

MW (Da):　アナライトの分子量（Da）

Highest Concentration:　5 濃度の中で一番高い濃度
※　左列の濃度単位は変更可能です。どちらかが必ずモル濃度になります。

Dilution:　希釈倍率
※　希釈倍率を入力すると、Conc(1)〜Conc(5)の濃度が自動入力されます。

ダブルリファレンスを取るために、0 濃度は必ず 1 サイクル実施します。また、固定化直後で、ベースラインがドリフトしている場合は、0 濃度のサイクルを複数回実施することをおすすめします。アナライト濃度は、K_D 値付近が望ましいですが、K_D 値が不明な場合は、1.5 μM より 5 倍希釈系列で濃度を振り、暫定 K_D 値を求めた後、K_D 値付近で濃度を振ります。

※　再生できないもしくは再生条件を決定していないアナライトで、解離時間を長くとることで自然解離させることができる場合は、複数回の測定もしくは複数サンプルの測定が可能です。

Next>をクリックします。

↓

Rack Positions ダイアログが表示されます。テーブルにしたがいサンプルをラックにセットします。Next>をクリックします。

↓

確認画面が表示されます。確認後、Start をクリックします。

↓

作成したテンプレートを保存する場合は、Save As...で名前をつけて保存します。保存しない場合は、Don't Save をクリックします。

↓

結果の保存先とファイル名を指定後、Save をクリックします。測定を中断する場合は、補足 3-2.（30 ページ）を参照してください。

↓

測定が終了すると、システムは Standby 状態になります。Standby の終了方法は、2-1-4.（22 ページ）を参照してください。取得データは自動保存され、Biacore X100 Evaluation Software が立ち上がり、取得データが開きます。

別のアナライトについても測定を行う場合には、固定化し直すことをおすすめします。リガンドが安定な場合には、ランニング緩衝液を流し続けることで、結合したアナライトを自然解離させ、再測定することができます。

補足 3-10. サンプリング設定

サンプル位置は、同一サンプルの場合、同一バイアルに設定されており、添加回数分の量が設定されています。サンプリング設定を変更したい場合は、プーリング機能の設定を変更します。

Menu から Automatic Positioning...を選びます。

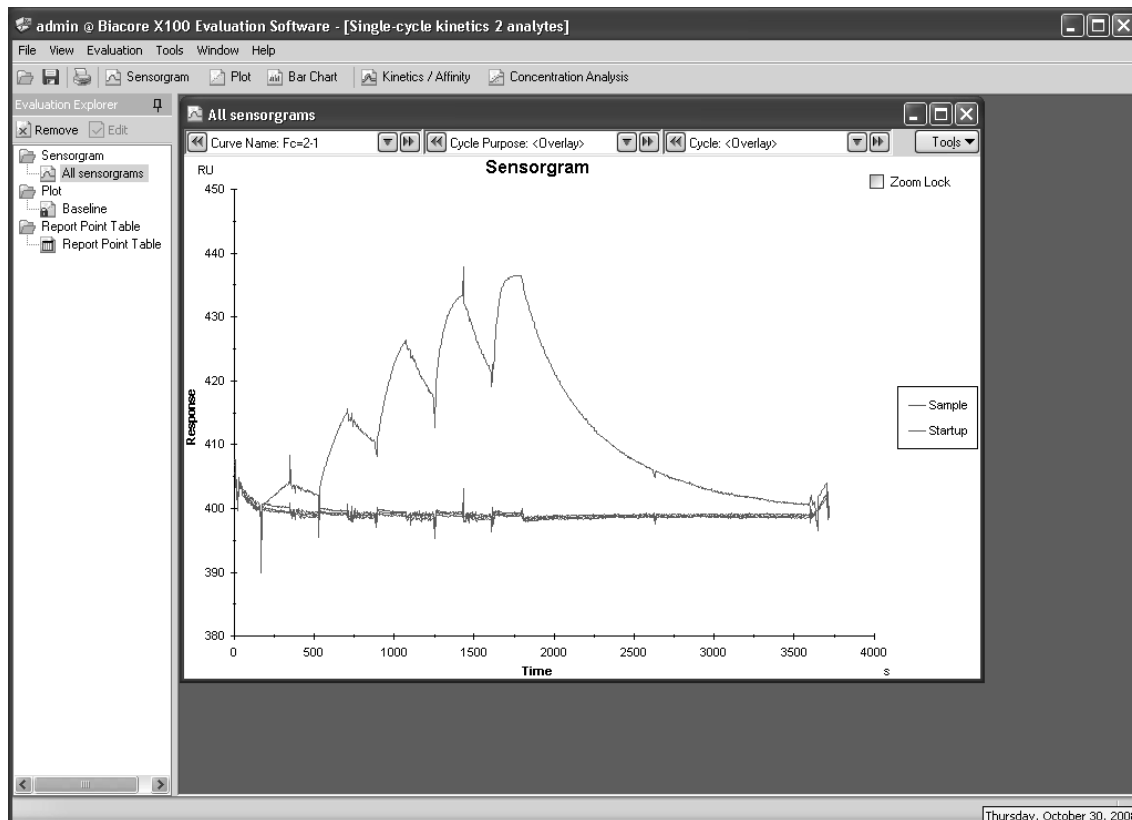
↓

"Pooling"の項目は、通常、Yes になっています。

添加回数分、分注して配置する場合は、"Pooling"のプルダウンメニューから No を選択し、ダイアログ右下の OK をクリックします。

3-5. データ解析

3-5-1. カイネティクス解析

ここでは、シングルサイクル法で取得したデータをもとに説明しますが、マルチサイクル法の場合も、解析手順および評価方法は同じです。

Biacore X100 Evaluation Software のツールバーの Kinetics / Affinity をクリックします（アナライト情報の入力ミスがある場合は、解析前に変更を行います。補足 3-11.（73 ページ）を参照してください）。

補足 3-11. アナライト情報の変更

アナライト濃度、濃度単位、アナライト名などの入力ミスがある場合は、**Keyword Table** から入力を変更します。**Tools...** → **Keyword Table...**をクリックします。

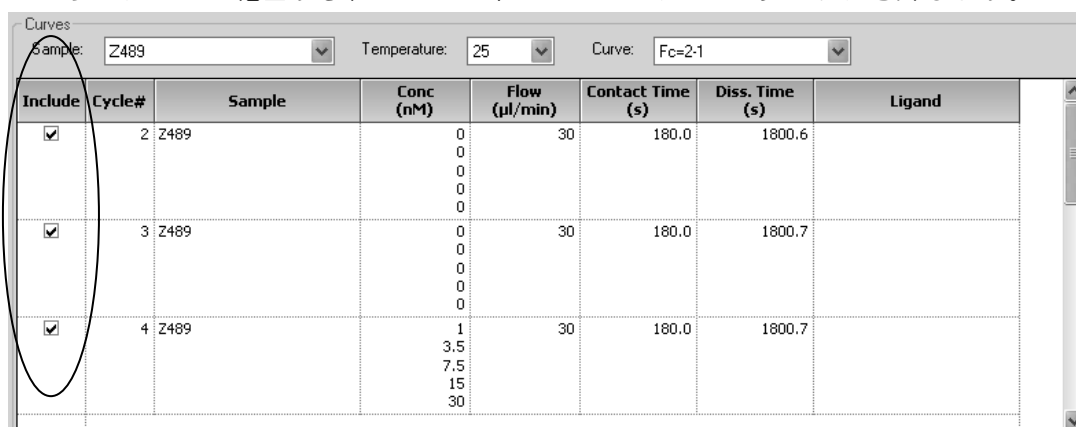
Cycle	Cycle Purpose	Sample	Conc [µg/ml]	MW [Da]
1	Startup	Buffer		
2	Startup	Buffer		
3	Startup	Buffer		
4	Startup	Buffer		
5	Startup	Buffer		
6	Sample	LNFP2	0	853.8
7	Sample	LNFP2	2	853.8
8	Sample	LNFP2	3.9	853.8
9	Sample	LNFP2	7.8	853.8
10	Sample	LNFP2	15.6	853.8
11	Sample	LNFP2	31.25	853.8
12	Sample	LNFP2	62.5	853.8
13	Sample	LNFP2	125	853.8
14	Sample	LNFP2	250	853.8
15	Sample	LNFP2	500	853.8
16	Sample	LNFP2	1000	853.8
17	Sample	LNFP2	0	853.8
18	Sample	LNFP2	250	853.8

目的のセルをクリックして、変更を行います。

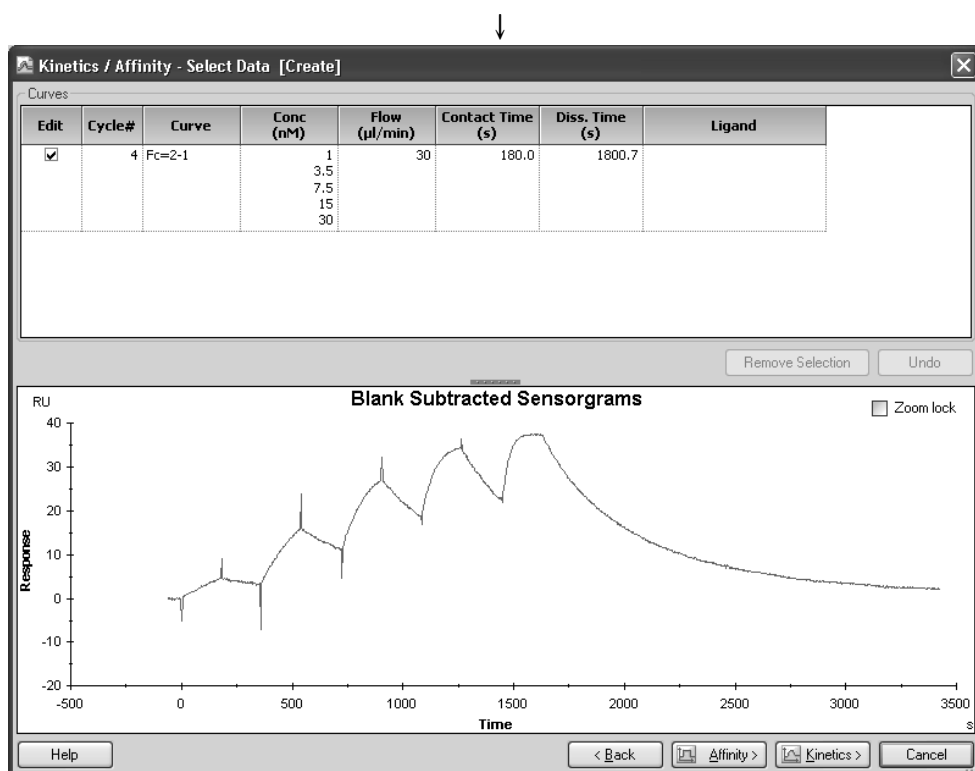
↓

同一アナライト名のセンサーグラムが重ね書き表示されます。複数のアナライトについて同時測定している場合は、**Sample:**右側の をクリックし、解析したいアナライトを選択します。その中から、必要に応じて、センサーグラムの抽出を行います。補足 3-12.を参照してください。

補足 3-12. センサーグラムの抽出

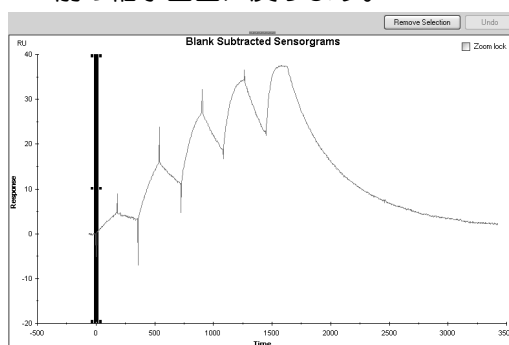
エアーの混入などの理由で、解析データから外したいセンサーグラムがある場合は、そのセンサーグラムに相当する、テーブル中の **Include** カラムのチェックを外します。

チェックされたセンサーグラムのみ重ね書き表示され、解析されます。

Next>をクリックします。

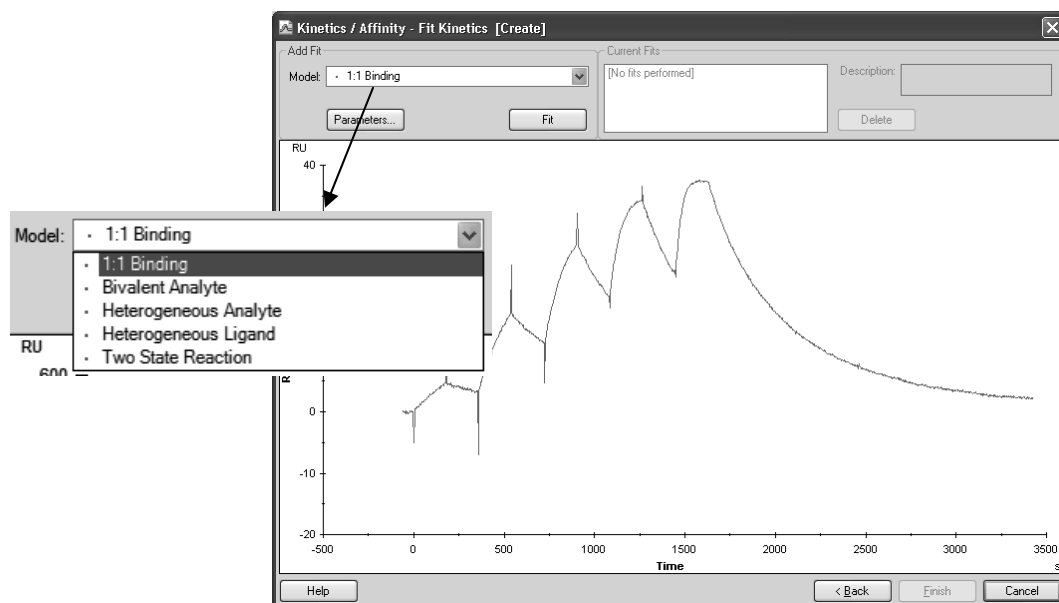
↓

濃度 0 のセンサーグラムが、全センサーグラムから差し引かれます。濃度 0 のセンサーグラムが複数ある場合には、平均したセンサーグラムが差し引かれます。

必要に応じて、データの部分的な削除を行います。補足 3-13.を参照してください。

補足 3-13. センサーグラムの部分的な削除

エアーの混入などが理由で、センサーグラム上に削除したい領域がある場合は、マウスの左ボタンをドラッグし、削除したい領域を拡大したのち、マウスの右ボタンをドラッグして、削除領域を選択します。拡大図を解除する場合は、センサーグラムを含まない余白をダブルクリックすると、1 つ前の縮小画面に戻ります。

領域を選択すると、グラフの右上の Remove Selection ボタンがアクティブになります。クリックすると、データが削除されます。

Kinetics>をクリックします。

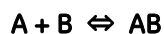
↓

Model:でフィッティングに採用する反応モデルを選択します。![]をクリックすると、すべての反応モデルが表示されます。反応様式が不明な場合は、1:1 Binding を選択します。反応モデルについては、補足 3-14.を参照してください。

補足 3-14. 反応モデル

リガンドを B、アナライトを A とします。

- **1:1 Binding**

  リガンドとアナライトが一分子同士で結合する最も単純な反応モデル。

  A + B ⇔ AB

- **Bivalent Analyte**

  アナライトが二価もしくはホモ二量体の反応モデル。AB 複合体形成後、リガンド B が二次的に結合する反応。

  A + B ⇔ AB， AB + B ⇔ AB2

- **Heterogeneous Analyte**

  競合反応モデル。リガンド上の 1 種類の結合部位を 2 種類のアナライトが競合する反応。

  A1 + B ⇔ A1B， A2 + B ⇔ A2B

- **Heterogeneous Ligand**

  アナライトに対して親和性の異なる 2 つの結合部位を持つリガンドにアナライトが並行して結合する反応モデル。

  A + B1 ⇔ AB1， A + B2 ⇔ AB2

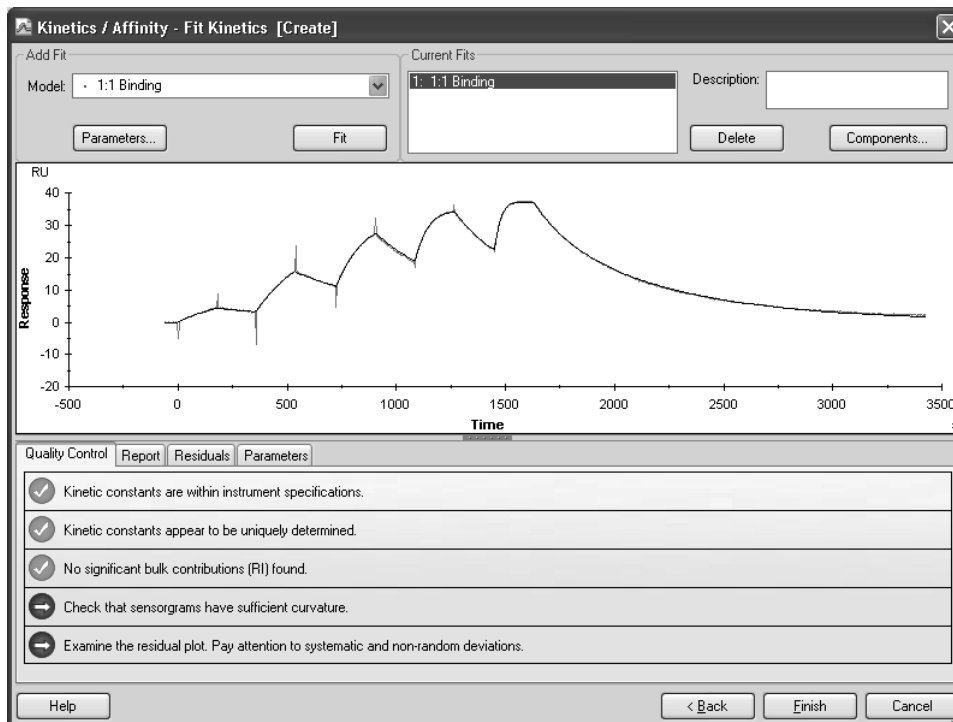
- **Two state Reaction (conformation change)**

  リガンドとアナライトの一分子同士の結合ですが、複合体形成後コンフォメーション変化を起こす反応モデル。

  A + B ⇔ AB ⇔ AB*

選択後、Fit をクリックします。

↓

解析結果が表示されます。

黒色のセンサーグラムは、フィッティングにより作成されたフィッティングカーブです。
1:1 Binding を選択した場合に限り、センサーグラム下に Quality Control テーブルが表示されます。

補足 3-15. 解析結果の Quality Control

5 項目の品質評価結果が、ステータスマークで表示されます。

ステータスマーク

- ✓ クオリティーアセスメントをパスしています。
- ! クオリティーアセスメントの許容限界に近いです。
- × クオリティーアセスメントをパスしていません。
- ⇨ ニュートラルまたは各自で確認が必要です。

品質評価基準

①反応速度定数はシステムのスペック範囲内ですか？

スペック範囲　$k_a = 10^3 \sim 10^7$ (1/Ms)、$k_d = 10^{-5} \sim 0.5$(1/s)

②各パラメーターは独立して算出されていますか？

k_a、k_dおよび R_{max}について、解析結果に与えるパラメーター間の相関性を確認しています。マストランスポートリミテーション下で測定した結果は、k_aと k_dに相関性が見られます。

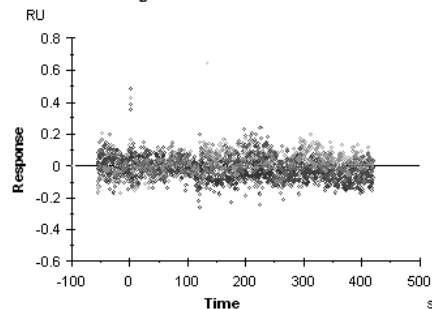
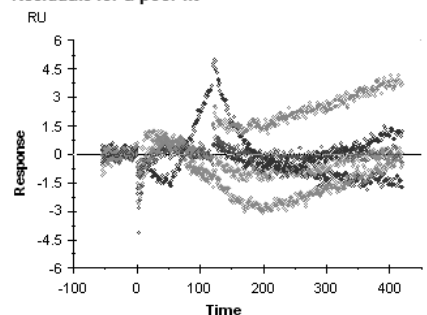
③溶液効果の値（RI）の妥当性は？

リファレンスセルおよびアナライトのゼロ濃度を差し引いている場合には、RI は限りなくゼロとなるが、結合・解離速度が速くセンサーグラムが箱型の場合には、結合レスポンスを、RI と算出してしまうことがあります。

④センサーグラムはカーブを描いていますか？

センサーグラムの結合・解離領域の形状が直線的な場合には、算出された各パラメーターの信頼性は低いです。

⑤フィッティングカーブに対して測定プロットは、ランダムに分散していますか？

Residuals タブをクリックして、残差プロットを確認します。Y 軸のゼロ近傍で、ランダムにプロットが分散している場合は、良好なフィッティングと判断します。ランダムに分散していない場合には、算出された各パラメーターの信頼性は低いです。

●**Report** タブ　　算出された各種パラメーターを確認できます。

Curve	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	Conc (M)	tc	Flow (ul/min)	kt (RU/Ms)	RI (RU)	Chi² (RU²)	U-value
	1.576E+6	0.003258	2.067E-9	40.00		1.641E+7				0.249	1
Cycle: 4					1.000E-9		30.00	5.100E+7	0.1585		
					3.500E-9				0.4129		
					7.500E-9				-0.1520		
					1.500E-8				-0.5975		
					3.000E-8				-0.1167		

k_a (1/Ms)　　結合速度定数

k_d(1/s)　　解離速度定数

K_D(M)　　解離定数

R_{max}(RU)　　アナライトの結合最大量

RI(RU)　　溶液効果（bulk effect）

Chi^2 (RU^2)　　カイ二乗

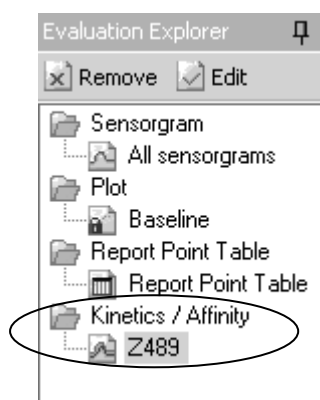
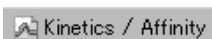
●**Residuals** タブ　　残差プロットが確認できます

●**Parameters** タブ　　各解析値のスタンダードエラーが確認できます

（再解析を行う場合には、引き続き解析を行います。補足 3-17.（82 ページ）を参照してください）

Finish をクリックします。

↓

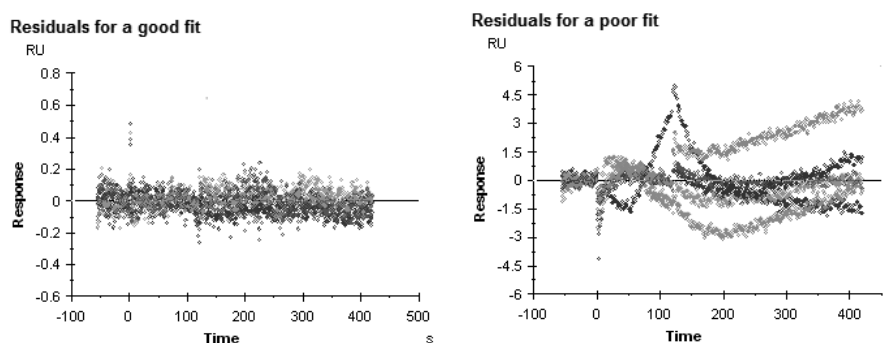
解析結果は、画面左端の Evaluation Explorer 中のフォルダに追加保存されます。ファイル名は自動的にアナライト名が採用されます。

引き続き、同時に測定した別のアナライトについて解析する場合は、ツールバーの Kinetics / Affinity をクリックします。

補足 3-16. フィッティング結果の評価

フィッティングが良好な場合、センサーグラムとフィッティングによって得られたフィッティングカーブがほぼ重なります。特に、センサーグラムの傾きが大きく異なる場合、フィッティングは良好ではないと判断します。また、解析結果の RI 値が 0(RU)に近いか確認します。

統計学的には、以下の各項目を確認します。

Residual

Residuals タブをクリックして、残差プロットを確認します。Y 軸のゼロ近傍で、ランダムにプロットが分散している場合は良好なフィッティングと判断できます。

Chi² 値

測定データとフィッティングカーブ間の差を示します。良好なフィッティングでは、シグナルノイズの平均平方値に一致します。

U-value

解析値が信頼できるか否かを判断する値です。15 以下であれば問題ありません。25 以上の場合には、算出された値の信頼性は低いです。

SE (Standard error)

Parameters タブをクリックすると、各パラメーターについて SE（標準誤差）が表示されます。各パラメーターの解析結果に対して、SE の値が 10% 以下であれば、良好であると判断します。

フィッティングが良好ではない要因

①フィッティングに採用したモデルが異なっています

②箱型のセンサーグラムです

③経時的なリガンドの活性低下が考えられます

④再生が不十分です

⑤アナライト濃度の調製ミスが考えられます　など

①が要因と考えられる場合は、再度妥当な反応モデルを選択し解析します。

②が要因の場合、解析結果の RI がセンサーグラムのレスポンスの大半を占める値になることがあります。これは、結合解離領域の急激なレスポンスの変動を RI とみなしてしまうか

らです。この場合は、RI=0（Constant）として、再解析する必要があります。
複数濃度のセンサーグラムから 1 つの定数を算出する解析方法では、すべての濃度のセンサーグラムにおいて k_a, k_d, R_{max} が同一のパラメーターであることが前提となります。しかし、前頁③～⑤の実験状況では、各濃度のセンサーグラムにおいて、これらのパラメーターは必ずしも一致しません。
たとえば、R_{max} は、リガンドに対するアナライトの最大結合量（RU）であり、理想的な実験系では、連続して同一セルを使用している限り、どの濃度のセンサーグラムに対しても同一値です。ところが、リガンドの再生が不十分な場合や、再生操作によりリガンドの活性がサイクル毎に低下している場合には、R_{max} はサイクル毎に低下します。フィッティングが良好でない要因が、測定結果から明らかに R_{max} にある場合は、R_{max} が同一パラメーターであることを解除し再解析します。

補足 3-17. カーブフィッティングにおける再解析

反応モデルの変更

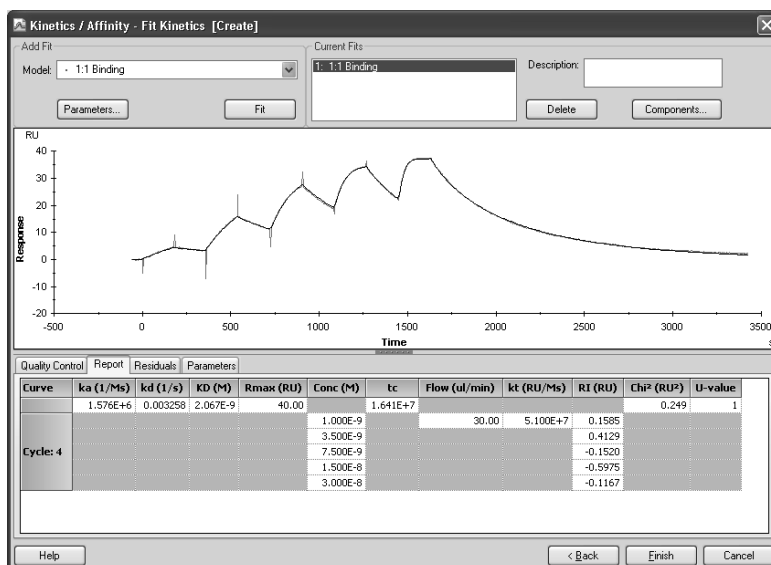
反応モデルを変更し再解析する場合は、**Finish** をクリックせず、**Add Fit** ボックスの **Model:** 右側の▼をクリックし、新しい反応モデルを選択します。**Fit** をクリックします。

↓

新しい解析結果が表示されます。

解析したすべての結果は、履歴として、**Current Fits** ボックスに残ります。

前の解析結果を見る場合は、**Current Fits** ボックスの目的の反応モデルをクリックすると結果が表示されます。終了後、**Finish** をクリックします。

解析パラメーターの解析設定条件の変更

解析パラメーター（R_{max},RI）の解析設定条件を変更し再解析する場合は、**Add Fit** ボックスの **Parameters** をクリックします。

↓

経時的なリガンドの活性低下や、マルチサイクル法において、再生の不十分さが原因で、全センサーグラムにおいて、R_{max}を同一パラメーターとみなせない場合、R_{max}の行の Fit カラムの▾をクリックし、Fit local を選択します。

箱型のセンサーグラムを解析する際に、濃度 0 のセンサーグラムを差し引いているにもかかわらず、センサーグラムの急激なレスポンスの変化を RI としてみなしてしまう場合、RI の Fit カラムの▾をクリックし、Constant を選択します。Initial value は自動的に 0 が入力されます。

Parameter Setting ダイアログ中の **OK** をクリックすると、条件が適用されます。

引き続き、Fit をクリックすると解析結果が表示されます。

補足 3-18. 解析履歴からの結果の消去

任意の解析結果を履歴から消去する場合は、**Current Fits** ボックス中の目的のデータを選択します。

Delete をクリックします。

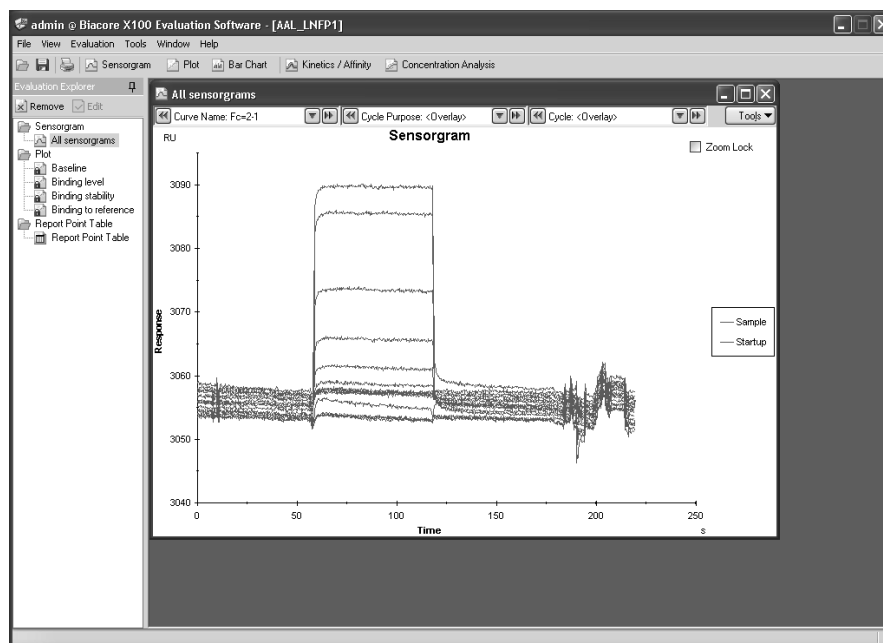
↓

確認ダイアログが表示されます。
消去する場合は **OK** をクリックします。

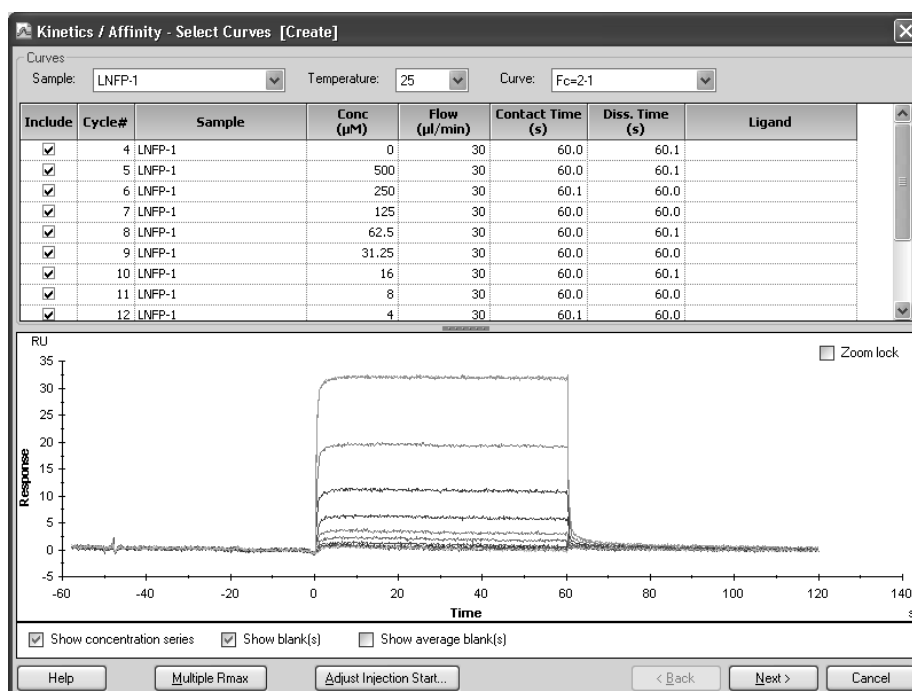
↓

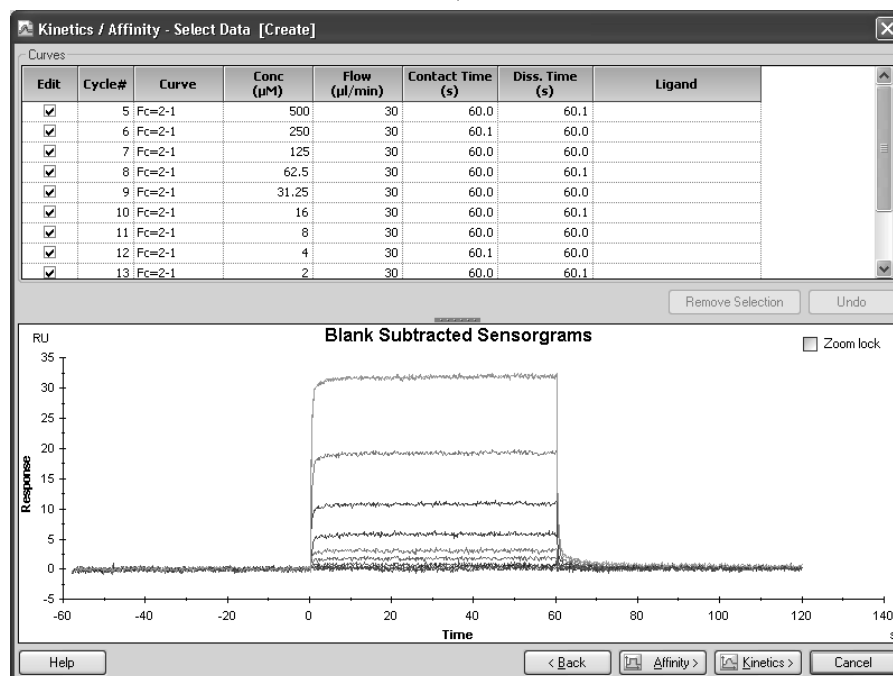
解析結果が **Current Fits** ボックスから消去されます。

3-5-2. 平衡値解析

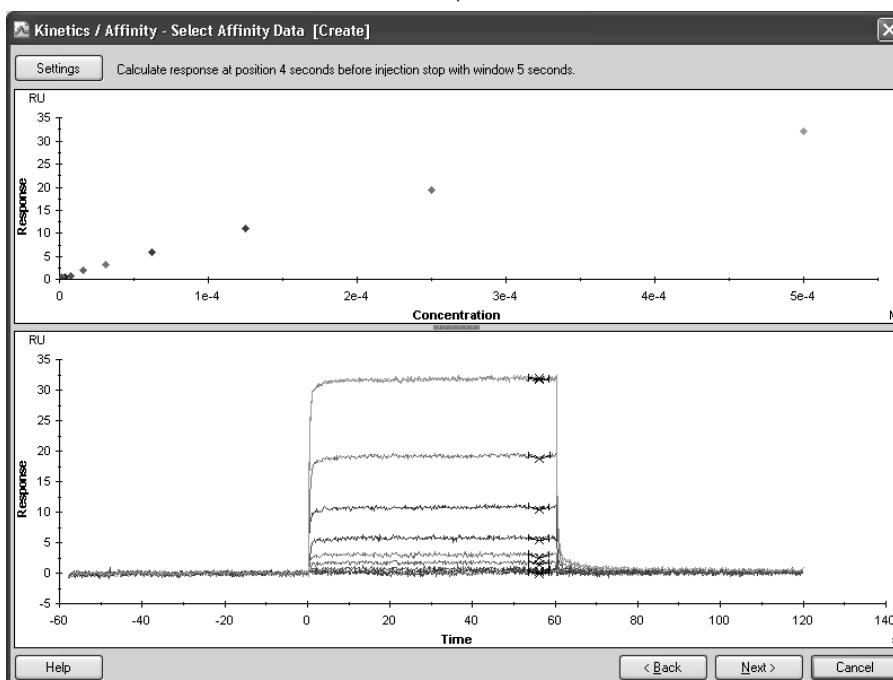
ここでは、マルチサイクル法で取得したデータをもとに説明しますが、シングルサイクル法の場合も、解析手順および評価方法は同じです。

ツールバーの Kinetics / Affinity をクリックします（サンプル情報の入力ミスがある場合は、解析前に変更を行います。補足 3-11.（73 ページ）を参照してください）。

↓

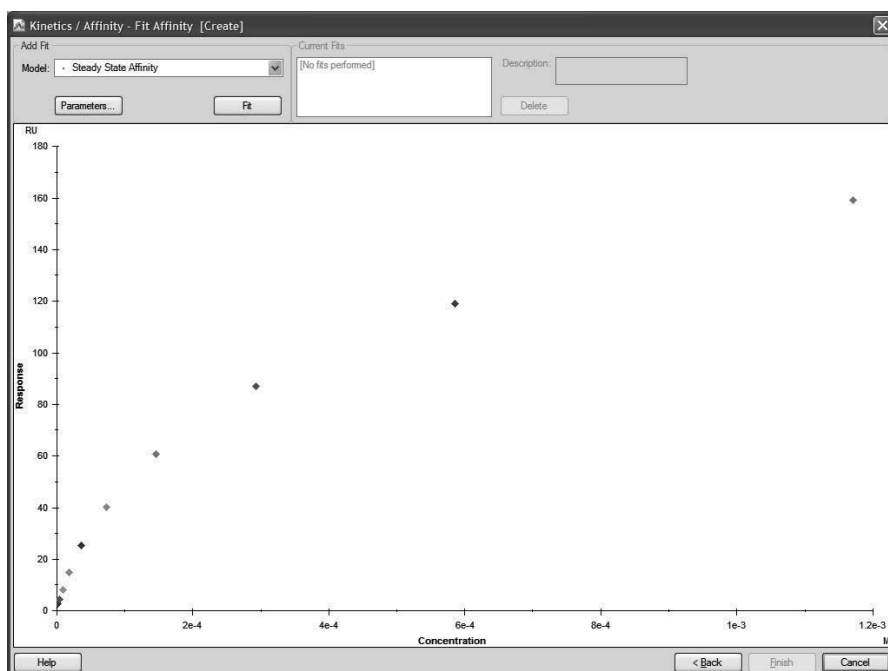
同一アナライト名のセンサーグラムが重ね書き表示されます。

必要に応じて、センサーグラムの削除を行います。補足 3-12.（74 ページ）を参照してください。Next>をクリックします。

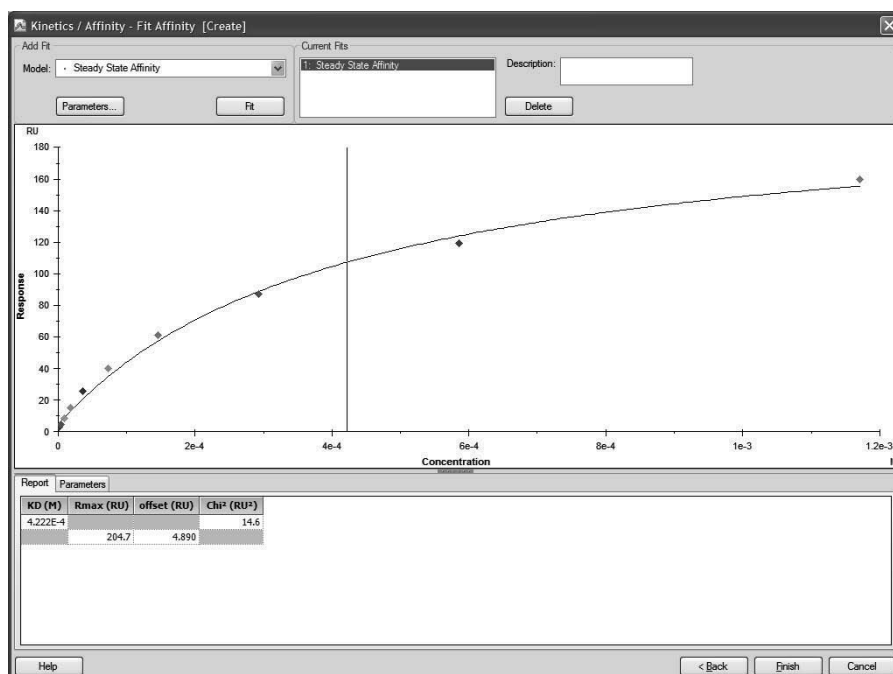
↓

濃度 0 のセンサーグラムが、全センサーグラムから差し引かれます。

Affinity>をクリックします。

↓

アナライト添加終了直前のレスポンス（RU）を平衡値（Req 値）（RU）とし、各アナライト濃度における Req 値がプロットされます。

Next>をクリックします。

↓

Fit Affinity ダイアログが表示されます。Model は、Steady State Affinity が自動選択されます。
Fit をクリックします。

↓

●**Report** タブ　　解析結果が表示されます。

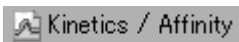
K_D(M)	解離定数
R_{max}(RU)	アナライトの最大結合量

offset(RU)	溶液効果（bulk effect）
$Chi^2(RU^2)$	カイ二乗
●**Parameters** タブ	解析に利用した各種パラメーターの確認が可能。

終了後、**Finish** をクリックします。

↓

Evaluation Explorer ウィンドウの Kinetics/Affinity フォルダに、解析結果が追加されます。ファイル名は、アナライト名が自動入力されます。

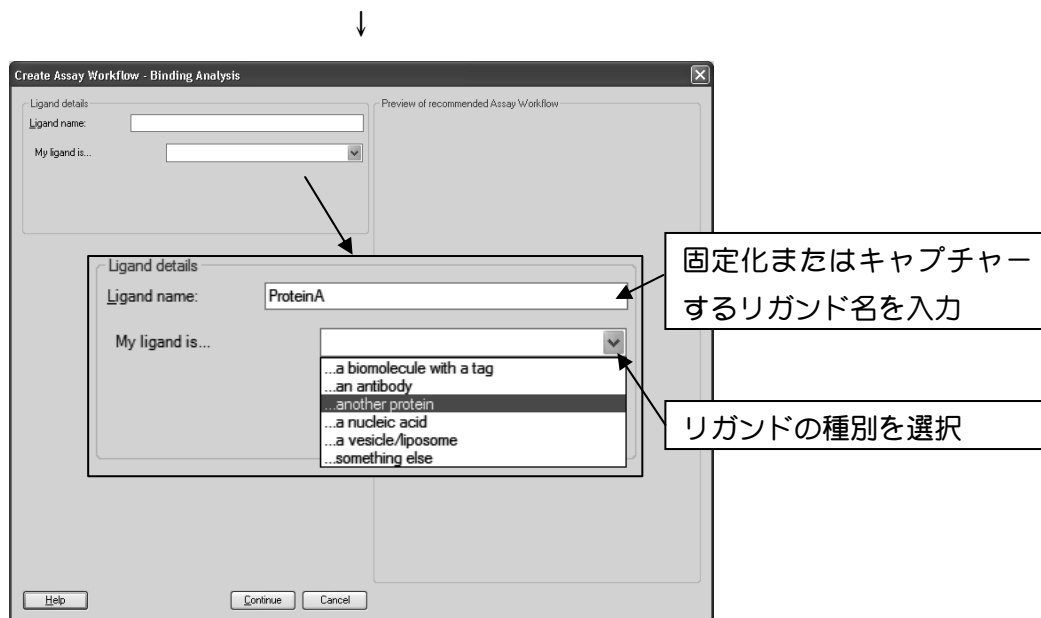
↓

引き続き、同時に測定した別のアナライトについて解析する場合は、ツールバーの Kinetics / Affinity をクリックします。

4. 結合の有無の確認、スクリーニング

4-1. ワークフローの作成

結合解析を行う際には、**Create Assay Workflow** の、 **Binding Analysis...**を選択します。

↓

↓

Binding Analysis のダイアログが表示されます。

補足 4-1. キャプチャー法によるリガンドの固定化

あらかじめセンサーチップ上に固定化したキャプチャー分子に、リガンドを補足する方法を、キャプチャー法と呼びます。

ワークフロー作成の、"Ligand details"の"My ligand is…"で、以下のリガンドの種別を選択すると、"Ligand attachement approach"に推奨する固定化方法が表示されます。

- …a biomolecule with a tag

My ligand is tagged with… （リガンドのタグ名）	推奨固定化法
…biotin	・Sensor Chip SA に固定化 ・Biotin CAPture kit によるキャプチャー（28-9242-33）
…GST	・抗 GST 抗体によるキャプチャー（GST capture kit, BR-1002-23）
…his	・Sensor Chip NTA に固定化
…another tag	・抗タグ抗体によるキャプチャー ・直接固定化

- …an antibody

My antibody is …（抗体の種別）	推奨固定化法
…a mouse antibody	・抗マウス抗体によるキャプチャー（Mouse Antibody Capture Kit, BR-1008-38）
…a human antibody	・抗ヒト抗体によるキャプチャー（Human Antibody Capture Kit, BR-1008-39）
…another antibody	・抗体認識抗体によるキャプチャー ・直接固定化

- …another protein

　リガンド認識抗体によるキャプチャーまたは直接固定化

キャプチャーキットを利用する場合は、キャプチャー分子の固定化の条件検討の必要がありません。添付説明書にしたがい、Immobilize ウィザードで固定化を行います。キャプチャーキット以外のキャプチャー分子の固定化を行う場合は、直接リガンドを固定化する場合と同様に条件検討が必要となります。

なお、キャプチャー分子は、フローセル 1 および 2 に固定化を行います。ウィザードは、自動的にフローセル 1, 2 に固定化する設定になっています。

ここでは、**Immobilize ligand covalently using Sensor Chip CM5** を選択します。

↓

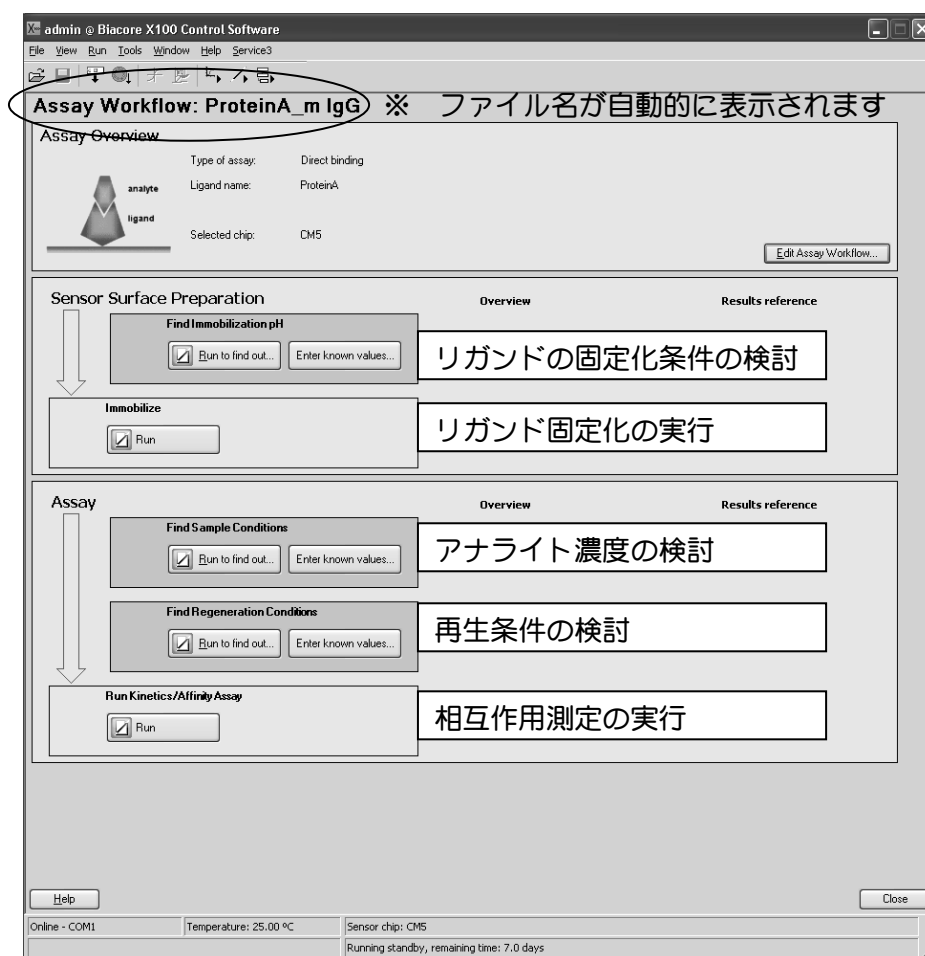
ダイアログ左下に **Ligand attachment overview**、右側に、**Preview of recommended Assay Workflow** が現れます。測定の流れを確認します。

Continue をクリックします。

↓

ワークフローの保存先を指定します。

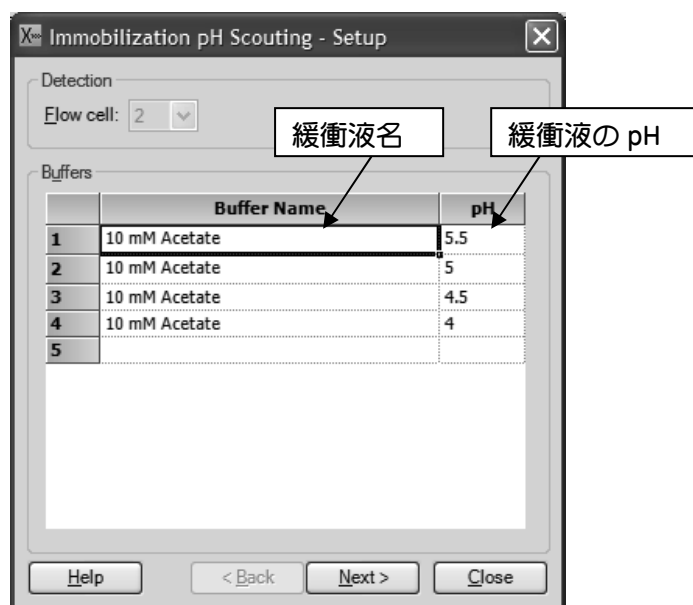
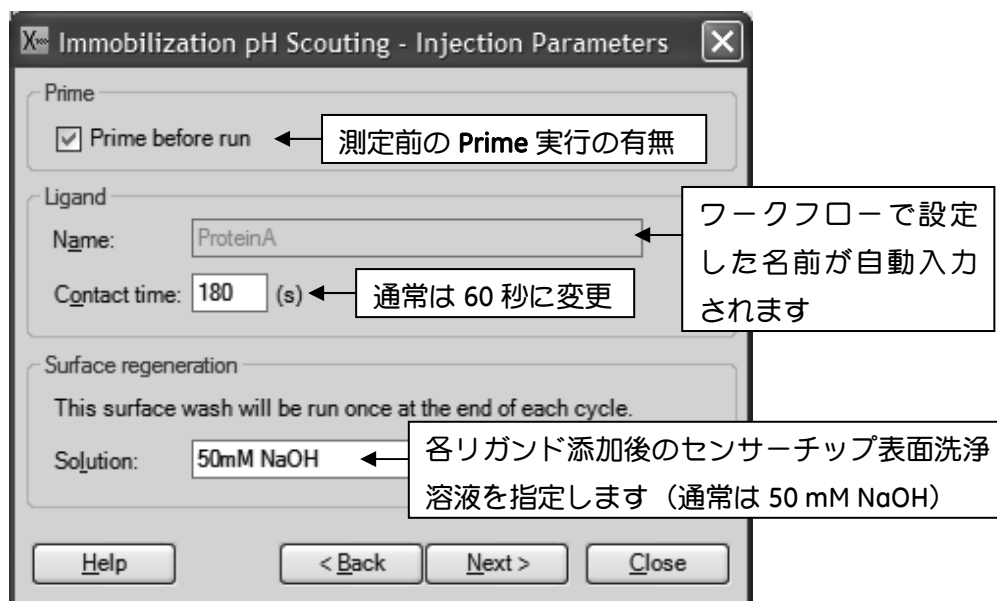
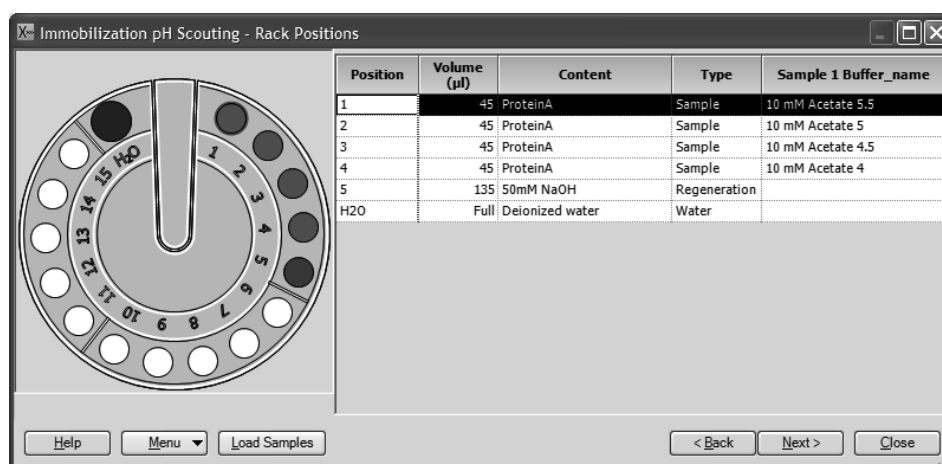
ワークフローを保存すると、その後、このワークフロー上で実施した測定条件や試験結果などは、紐づけして記録されます。**Save** をクリックします。

↓

すべてのステップにおいて、**Run to find out...**もしくは **Run** から、対応するウィザードを呼び出して実行します。得られた結果は、**Overview** に表示され、**Results reference** からデータを見ることができます。条件検討のステップで、すでに条件がわかっている場合は、**Enter known values...**から条件を入力すると、**Overview** に表示されます。

4-2. リガンド希釈液の pH 選択

リガンド希釈液の pH 選択の詳細については、Ⅲ-ⅱ.（実験をはじめる前に　F ページ）を参照してください。
ワークフローの **Sensor Surface Preparation** のウィザードを実行します。

↓

Find Immobilization pH の **Run to find out...**をクリックします（すでに固定化緩衝液が決まっている場合には、**Enter known values...**をクリックして、条件を入力します）。

必要に応じ、緩衝液名および緩衝液の pH を変更します。また、削除および追加設定も可能です。
Next>をクリックします。

↓

Next>をクリックします。

↓

Rack Positions ダイアログが表示されます。テーブルにしたがいサンプルをラックにセットします。

Next>をクリックします。

↓

確認画面が表示されます。確認後、Start をクリックします。

↓

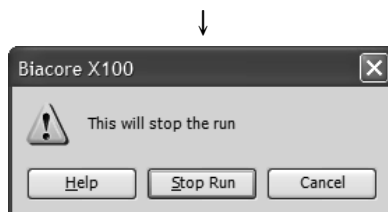
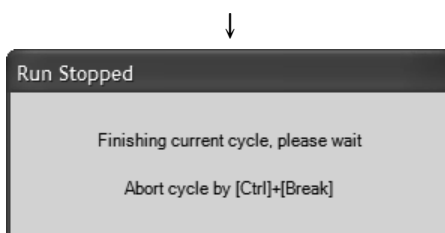
結果の保存先とファイル名を指定後、Save をクリックします。測定を中断する場合は、補足 4-2.（95 ページ）を参照してください。

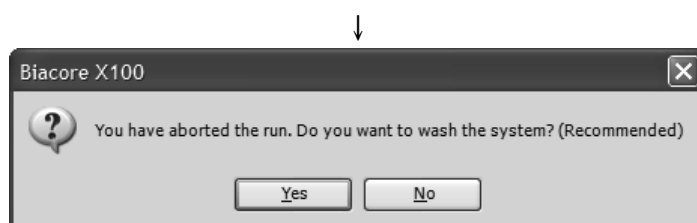
↓

測定を中断する場合、ツールバーの **Run** → **Stop Run...**をクリックします。

↓

Stop Run をクリックします。

↓

測定中サイクルの全コマンドを実行後、**Standby** 状態になります。

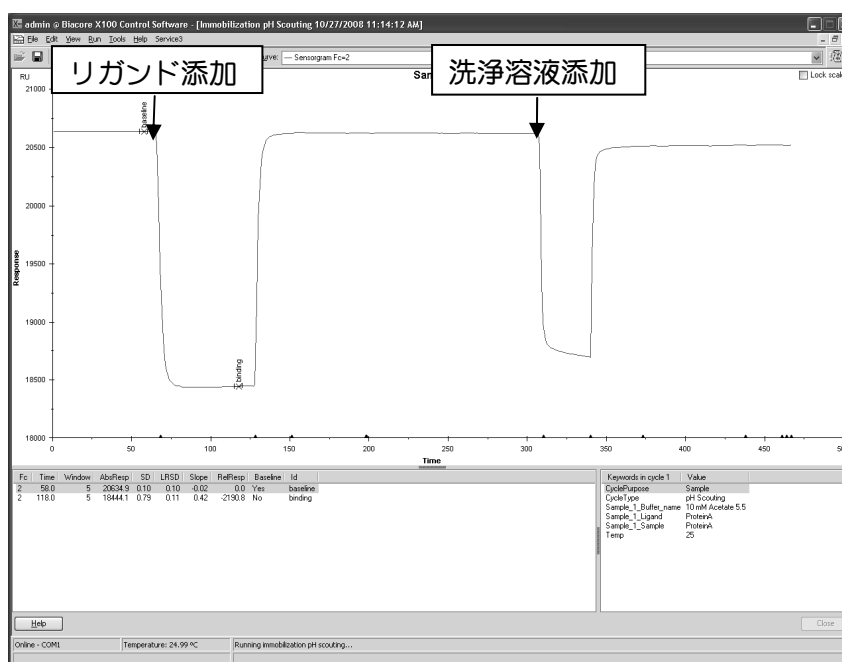
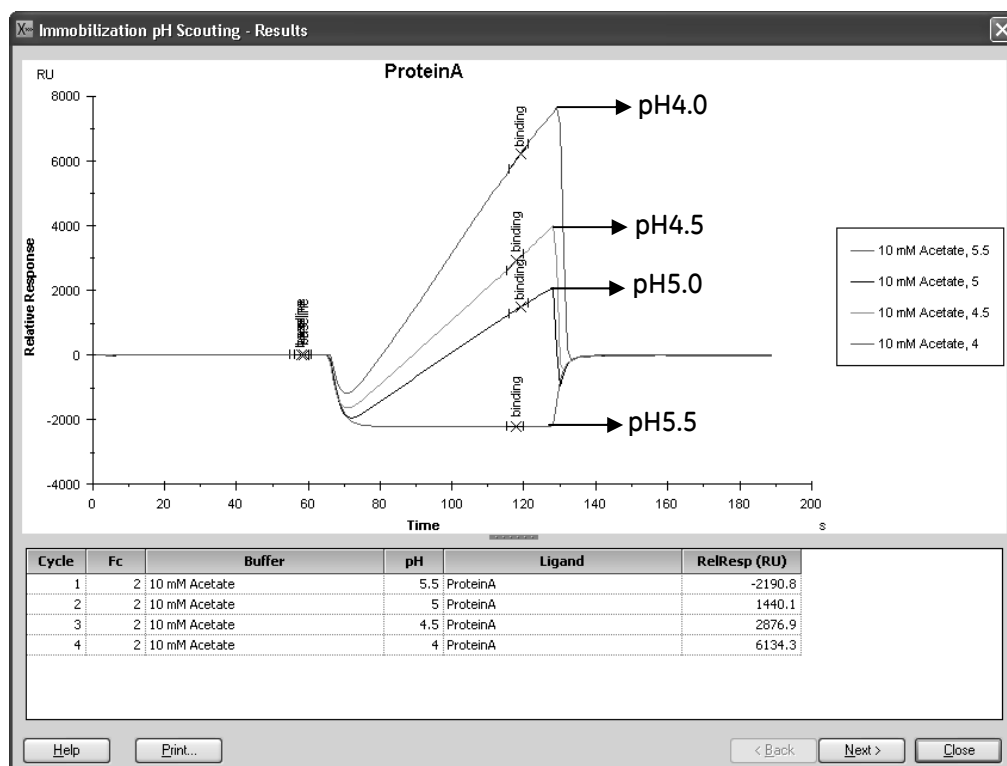
全コマンド実行終了を待たずに測定を中止したい場合には、キーボードの[Ctrl]キーと[Break]キーを同時に押します。

↓

システムの洗浄を行う場合には、**Yes** をクリックします。洗浄後停止します。

上記サイクルを 1 サイクルとして、指定した緩衝液の測定を行います。

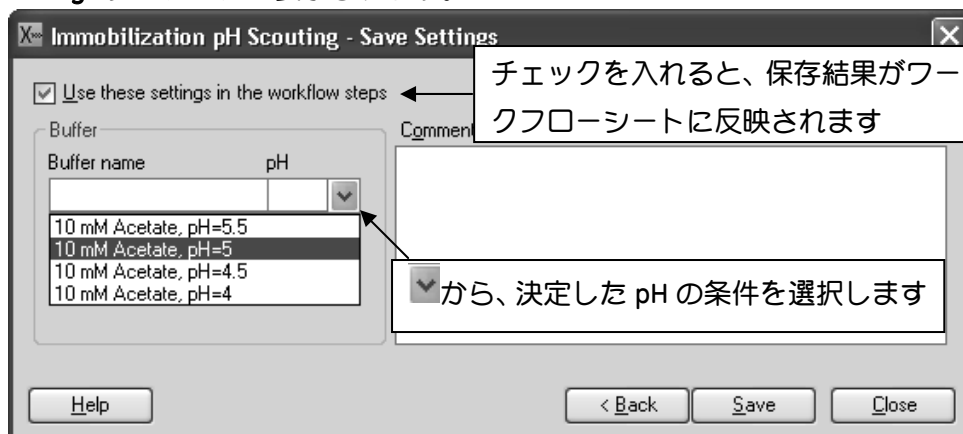
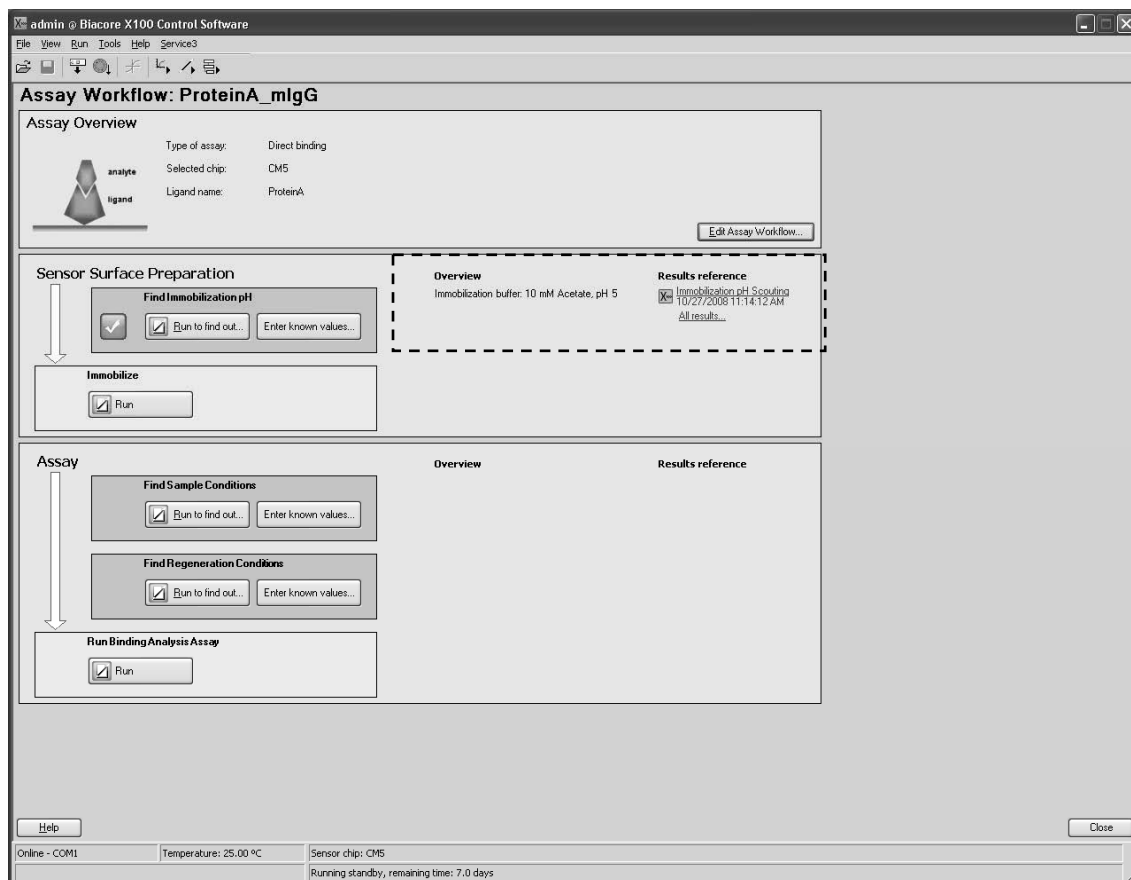
↓

測定が終了すると、システムは自動的に Standby 状態となります。Standby の終了方法は、2-1-4. （22 ページ）を参照してください。また、**Results** ダイアログが現れます。

Cycle	Fc	Buffer	pH	Ligand	RelResp (RU)
1	2	10 mM Acetate	5.5	ProteinA	-2190.8
2	2	10 mM Acetate	5	ProteinA	1440.1
3	2	10 mM Acetate	4.5	ProteinA	2876.9
4	2	10 mM Acetate	4	ProteinA	6134.3

各緩衝液添加時のセンサーグラムが重ね書きで表示されます。濃縮効果が確認できる最も高い pH 条件で固定化を行います（上記の場合、pH5.0 を採用します）。

補足 4-3. リガンド希釈液の pH の選択方法

濃縮効果が確認できる最も高い pH を固定化条件として採用します。
前頁結果では、pH4 が最も濃縮効果が高いですが、pH が低いほど、活性型 NHS 基とアミノ基とのカップリング効率は低下します（活性化 NHS 基とアミノ基の至適反応条件は pH8.5）。また、タンパク質の安定性は一般的に中性に近い程安定です。pH を変化させても、濃縮効果（添加時の傾き）に極端な差がない場合は、pH が高い条件を選択するのが望ましいです。前頁結果では、pH5 を選択します。
なお、Immobilization pH Scouting における濃縮レベル以上の固定化は困難です。確認した濃縮レベル（RU）よりもっと多くの固定化量を望む場合は、リガンド濃度を上げて（例 100 µg/ml など）、再度 Immobilization pH Scouting を実施し濃縮レベルを確認します。
濃縮効果が確認できる最も高い pH を固定化条件として採用します。

Next>をクリックします。

↓

Save Settings ダイアログが表示されます。

Save をクリックします。

↓

条件検討が終了すると、ワークフローシートの、**Find Immobilization pH** に（　）が入ります。**Overview** にリガンドの調製条件が表示され、**Results reference** で、**Find Immobilization pH** で実行した測定結果ファイルが表示されます。ファイル名をクリックすると、測定結果ファイルを開くことができます。複数のファイルがある場合には、**All results...**をクリックし、ファイルの確認を行います。

4-3. 固定化

固定化の詳細については、Ⅲ-ｉ.（実験をはじめる前に　B ページ）を参照してください。

Immobilize の [Run] をクリックします。

↓

ワークフローで実施する固定化は、フローセル 1 がリファレンスセル、フローセル 2 がリガンド固定化セルとして設定されています。活性化およびブロッキング時間は 7 分間です。

Next>をクリックします。

↓

Position	Volume (µl)	Content	Type
1	126	Ethanolamine	Immobilization
2	75	ProteinA	Immobilization
3	85	EDC	Mix Fc 2
4	85	NHS	Mix Fc 2
5	Empty	EDC/NHS, min. capacity 130µl	Mix Fc 2
H2O	Full	Deionized water	Water

Rack Positions ダイアログが表示されます。テーブルにしたがい必要サンプルをラックにセットします。

Ethanolamine	126 µl/ 11 mm プラスチックバイアル
Ligand	75 µl/ 11 mm プラスチックバイアル
EDC	85 µl/ 11 mm プラスチックバイアル
NHS	85 µl/ 11 mm プラスチックバイアル
空（NHS / EDC 混合用）	空/ 11 mm プラスチックバイアル

固定化時間・流速を変更した場合には必要量が変わります。

EDC と NHS を自動等量混合するための、空バイアルもセットします。

Next>をクリックします。

↓

確認画面が表示されます。確認後、Start をクリックします。

↓

結果の保存先とファイル名を指定後、Save をクリックします。**測定を緊急停止する場合は、[Ctrl]キーと[Break]キーを同時に押します。**補足 4-2.（95 ページ）を参照してください。

固定化が終了すると、システムは Standby 状態になります。Standby の終了方法は、2-1-4.（22 ページ）を参照してください。Immobilization Results ダイアログが表示されます。

固定化量（Response Bound と Response Final）（RU）が表示されます。

補足 4-4. 固定化量の評価

固定化量として Response Bound と Final の 2 種類が表示されます。Bound は、リガンド添加前後のセンサーグラムの高さの差、Final は、NHS / EDC 添加前からエタノールアミン添加終了後の差です。リガンドがアグリゲーションしている場合やセンサーチップ表面に吸着する場合は、エタノールアミンを添加することにより、非共有結合でセンサーチップ表面に残ったリガンドは洗い流されるため、Final のレスポンスは Bound より小さくなります。また、きわめて固定化量が少ない場合は、NHS 化した部分の大半に（一部はリガンドが導入されています）エタノールアミンが導入されるため、Final のレスポンスは Bound より大きくなることがあります。いずれの場合も、レスポンスが小さい方を固定化量として採用します。

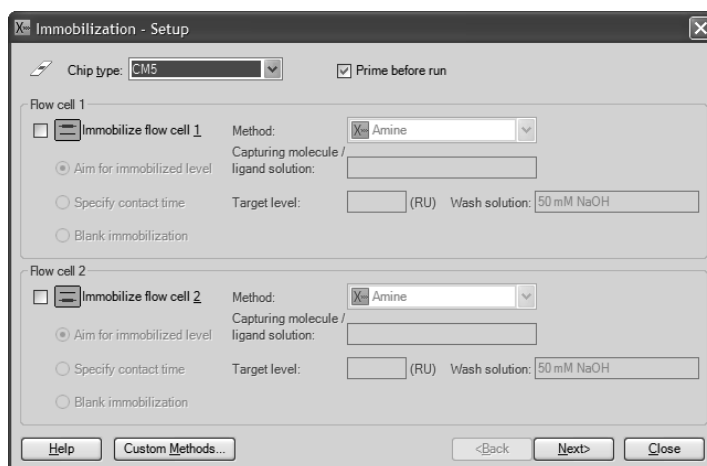
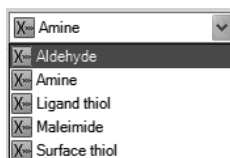
Immobilization Result ダイアログの Close をクリックします。センサーグラム右下の Close をクリックします。

↓

ワークフローシートの、Immobilize に (✓) が入ります。Overview にリガンドの固定化方法、固定化量などが表示されます。Results reference に、固定化の結果ファイルが表示されます。

補足 4-5. 固定化テンプレートの変更

固定化の流速や活性化時間の変更を行う際や、フローセル 1 への固定化やブロッキングを行うときには、ワークフローを閉じ、 **Wizards…** → **Immobilization** を実行します。
Other options の（ ）をクリックします。
Wizards… → **Immobilization** をクリックします。**New** をクリックします。

↓

Chip type を選択し、固定化を行うフローセルを選択します。
Method:のプルダウンメニューをクリックして選択します。

リガンド添加方法を選択します。

○**Aim for immobilized level**	Target level にターゲット固定化量を入力します。自動で固定化量を調製します。
Wash solution:	固定化前に実施する濃縮効果確認後の、チップ表面の洗浄溶液を指定します。通常は、50 mM NaOH を指定します（固定化前の洗浄ですので、リガンドへの影響はありません）。
○**Specify contact time**	入力した時間リガンドを添加します。
○**Blank immobilization**	活性化・ブロッキングのみ行います。

↓

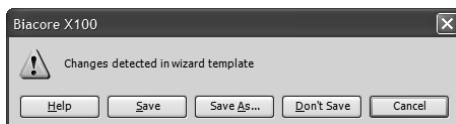
Next>をクリックします。

↓

Rack Position ダイアログが表示されます。テーブルにしたがいサンプルをラックにセットします。**Next>**をクリックします。

↓

確認後、**Start** をクリックします。

↓

作成したテンプレートを保存するかどうか、メッセージが表示されます。必要があれば、**Save As...**で名前をつけて保存を行います。保存しない場合は、**Don't Save** をクリックします。

↓

結果の保存先とファイル名を指定後、**Save** をクリックします。**測定を緊急停止する場合は、[Ctrl]キーと[Break]キーを同時に押します。**補足 4-2.（95 ページ）を参照してください。

↓

測定が終了すると、システムは **Standby** 状態になります。

メソッドの変更とコマンドの追加

① メソッドの変更

Setup ダイアログの **Custom Methods...**をクリックします。

↓

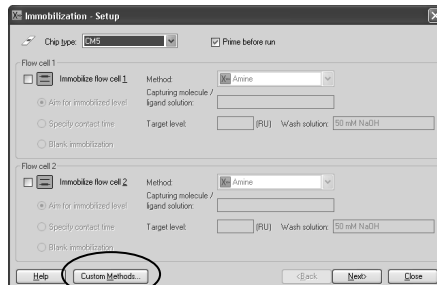
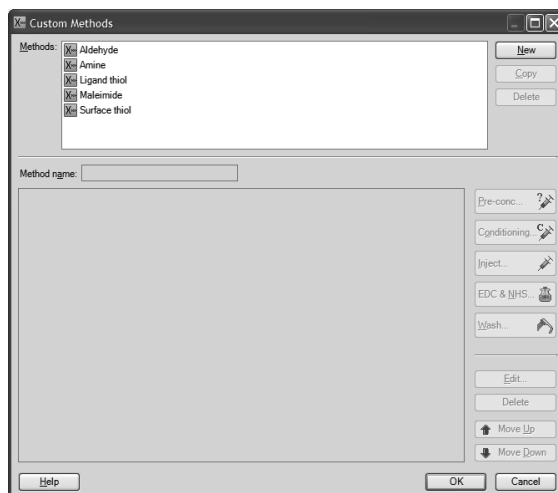
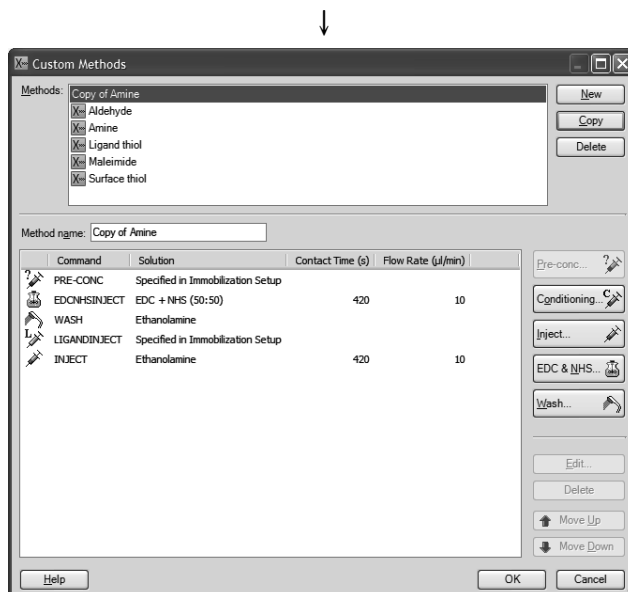
Methods:の各種固定化方法をクリックすると、テンプレートの固定化詳細が確認できます。テンプレートの固定化条件を変更する際は、固定化方法を選択した状態で、**Copy** をクリックします。

↓

Method に追加されます。**Method name** で名前の変更が可能です。
コマンドをダブルクリックまたは選択後 **Edit...**をクリックすると、各種設定の変更が可能です。

② コマンドの追加

ダイアログ右下のアイコンを選択して、コマンドを指定します。
OK をクリックします。

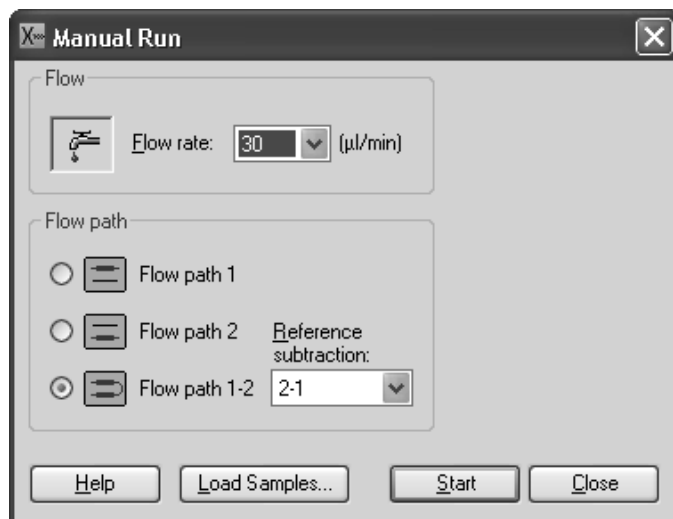
↓

変更および追加したメソッドは、**Set up** ダイアログの **Method：** で選択可能となります。

4-4. 特異的結合の確認および再生条件の検討

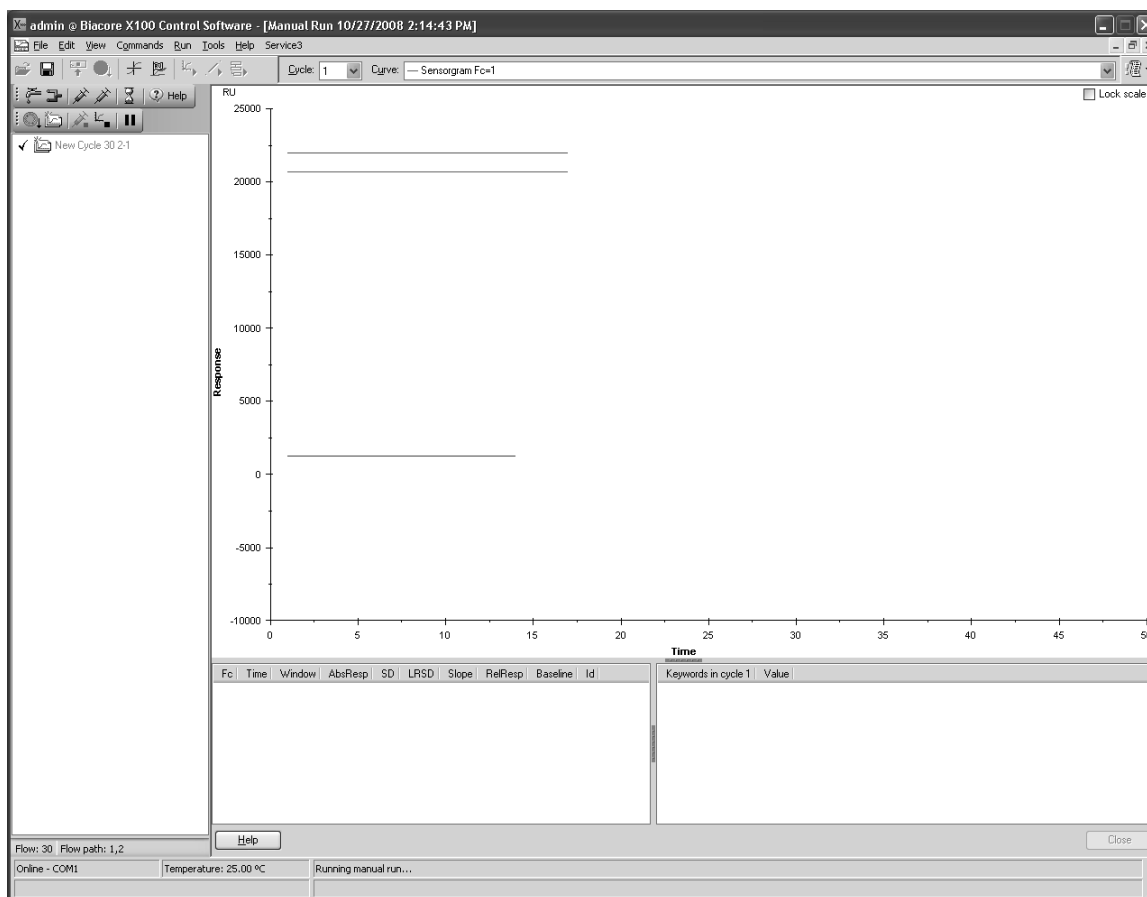
特異的結合の確認および再生条件の検討は、マニュアル測定でも、ワークフローからウィザードを使用した測定でも、両方対応できます。どちらかの測定方法を選択して条件検討を行います。

4-4-1. マニュアル測定による検討

ワークフローを一旦閉じます。
Other options の をクリックし、**Manual Run...** をクリックします。

↓

流速は 30 µl/min、Flow path は 1-2、Reference subtraction は 2-1 を選択します。測定前にサンプルをセットする場合は、Load Samples...をクリックし、サンプルラックのロックを解除します。ラックにサンプルをセットし、装置に戻して、再びロックします。
Start をクリックします。

↓

ファイル名を入力し、**Save** をクリックします。

フローセル 1 は赤、フローセル 2 は緑、2-1 の差し引きは茶色のセンサーグラムで表示されます。

補足 4-6. センサーグラムの表示の変更

・1 本表示

View → Show Only Current Curve

右上のカーブリストから、表示するセンサーグラムを選択します。

・全表示

View → Show All Curves

すべてのセンサーグラムが表示されます。

・種別表示

View → Show Curves of Same Type

カーブリストから、各フローセルのセンサーグラムまたは差し引きセンサーグラムを選択します。

補足 4-7. コマンドの説明

；流速の選択（流速 5、10、30 µl/min から選択）

；流路の切り替え（Detection1,2 に設定している場合利用可能）

；サンプル添加　（赤いシリンジ）

；再生溶液添加　（青いシリンジ）

；待機（次の操作コマンドを実行するまでの時間を任意で設定できます）

；ヘルプボタン（Support Navigator を表示）

；サンプルラックの取り出し

；サイクルの切り替え。センサーグラムを新たにスタートします。

；添加の中止（サンプルおよび再生溶液添加時に実行可能）

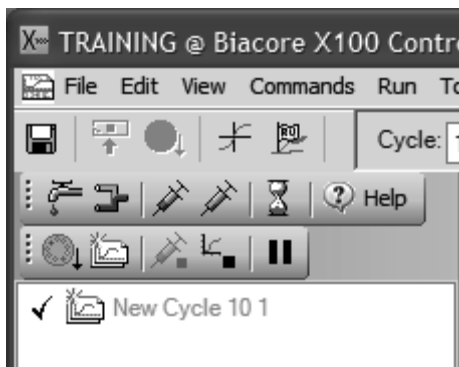
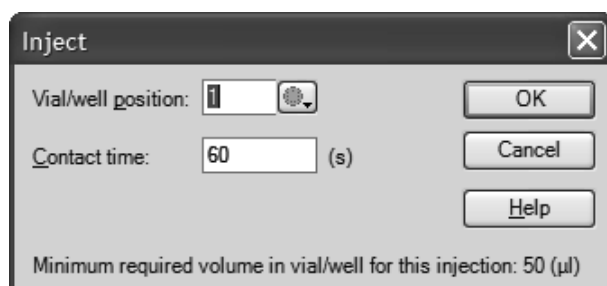
；測定の終了（すべてのコマンドを実行後に、Standby 状態に入ります）

；一時停止（予約コマンドの一時停止が可能）

；再スタート（一時停止の解除）

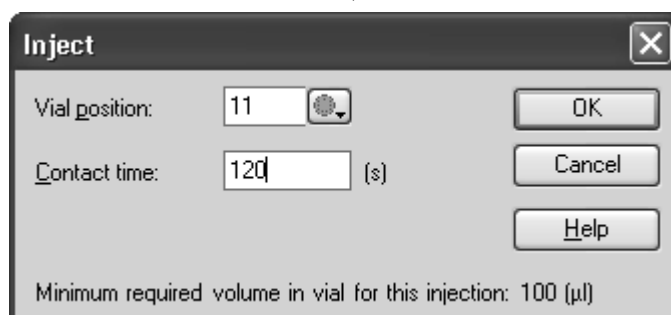
コマンドは、コマンドテーブルに任意で追加が可能です。追加されたコマンドは、上から順番に実行されます。実行中のコマンドは、 がつきます。実行が終了したコマンドは、✓ がつきます。

アナライトの添加

画面左上のアイコンを選択して、測定コマンドを指定します（各コマンドの説明は補足 4-7. を参照してください。または、 Help をクリックしサポートナビゲーターを参照してください）。

Injection command をクリックします。

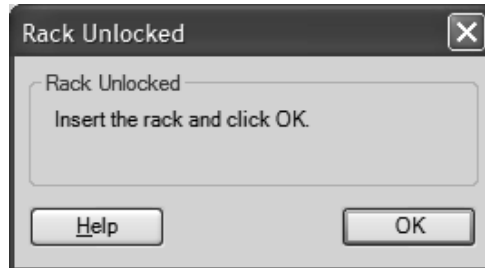
↓

Vial/well position:の をクリックし、アナライトをセットした位置にマウスを移動しクリックします。

↓

Contact time:にアナライト添加時間（通常 60 秒～120 秒）を入力すると、必要量がダイアログ下部に表示されます。バイアルに必要量を準備し、ラックにセットします。相互作用測定の条件検討の詳細は、Ⅳ-ｉ.（実験をはじめる前に　G ページ）を参照してください。
OK をクリックします。

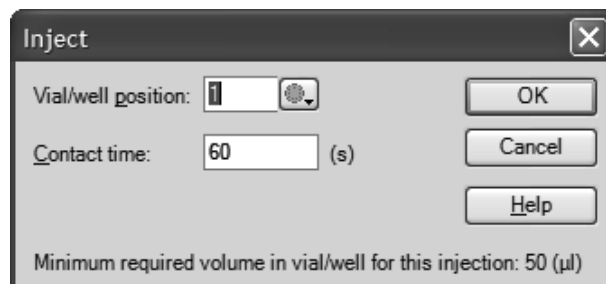
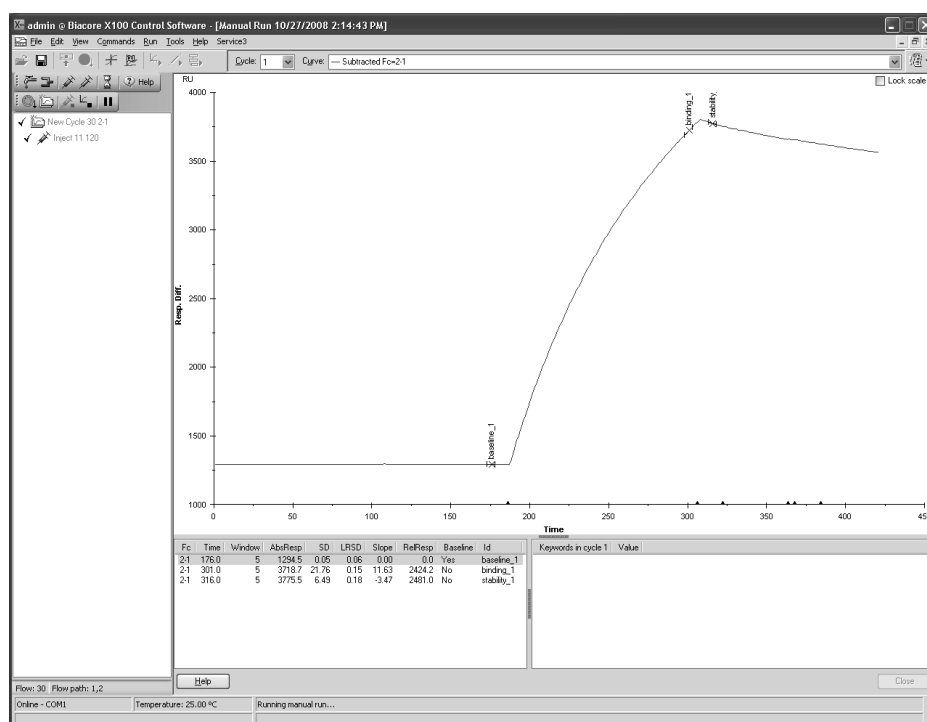
（測定を開始した後に、アナライトをラックにセットする場合は、一旦、**Cancel** をクリックし、**Inject** ダイアログを解除します）

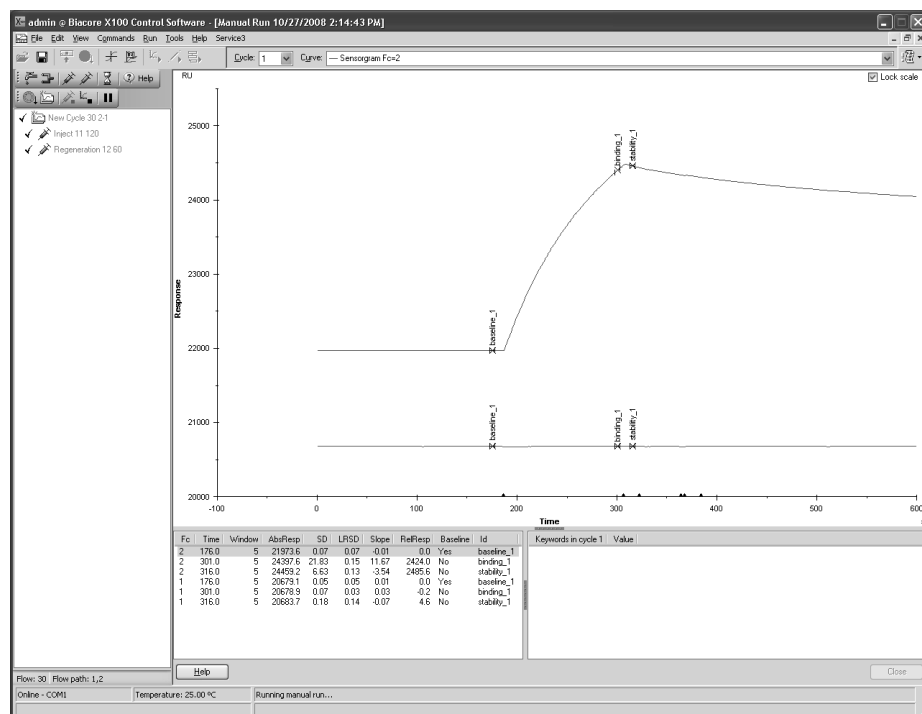
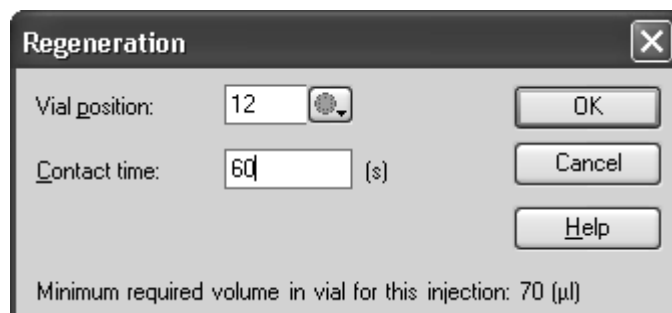
↓

Load Samples アイコン を選択します。

ラックを取り出し、必要量以上分注したアナライトをセットします。
ラックを再びシステムにセットし、OK を選択します。再び、**Injection command** をクリックします。

↓

アナライトをセットした位置および添加時間（秒）を入力します。

↓

Fc=2-1 の差し引きのセンサーグラムを表示させます。特異的結合が見られれば、アナライト添加後、センサーグラムは上昇します。

↓

Fc=1 のセンサーグラムを確認します。非特異的吸着があれば、アナライト添加後のセンサーグラムは上昇しています。

再生条件の検討

再生溶液の種類、添加時間については、D-1. 相互作用の条件検討を参照します。

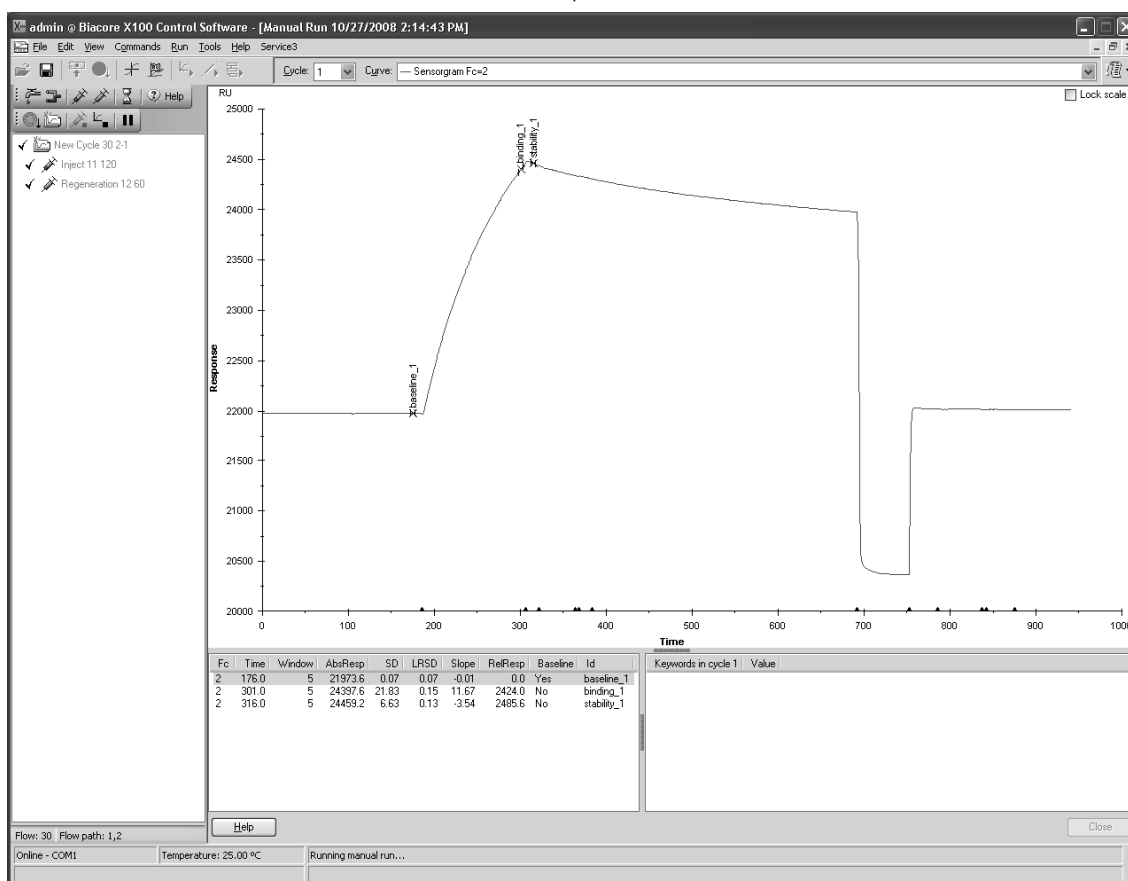
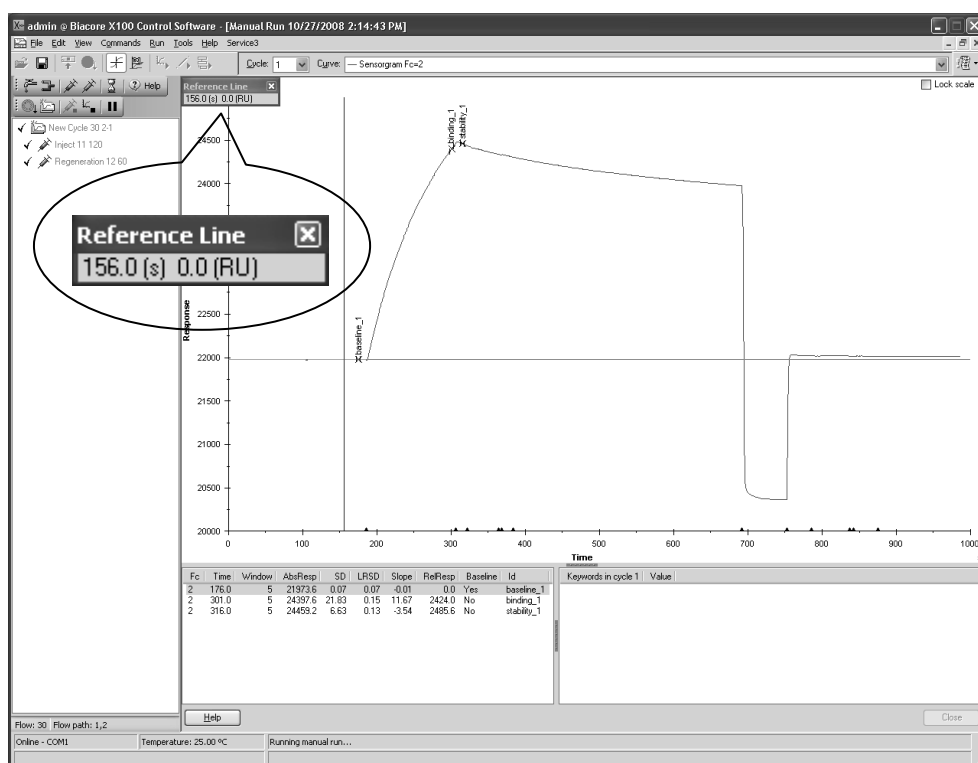
Regeneration Command をクリックします。

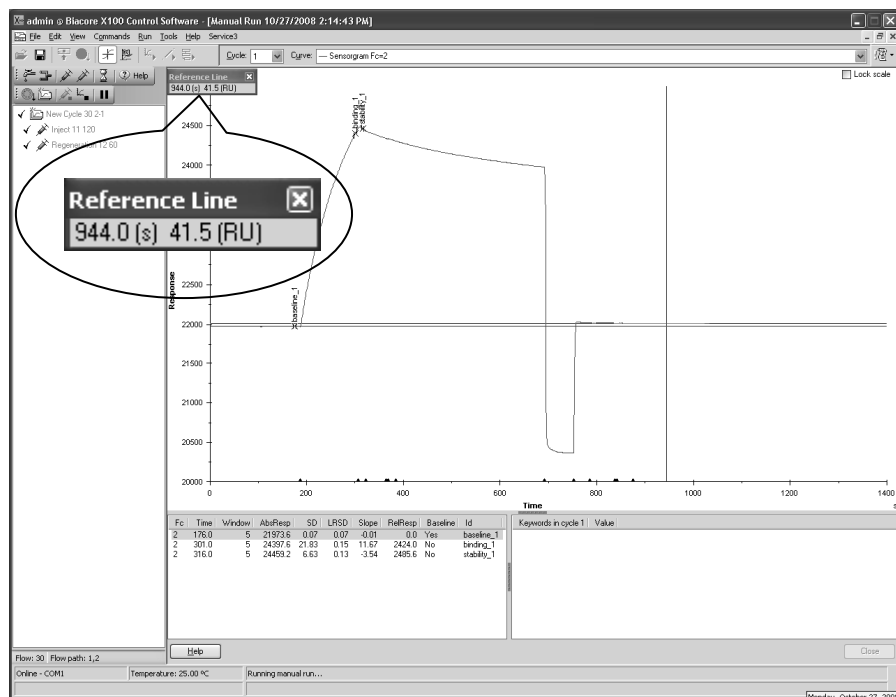
再生溶液のセット位置を選択、添加時間（s）を入力し、OK をクリックします。

↓

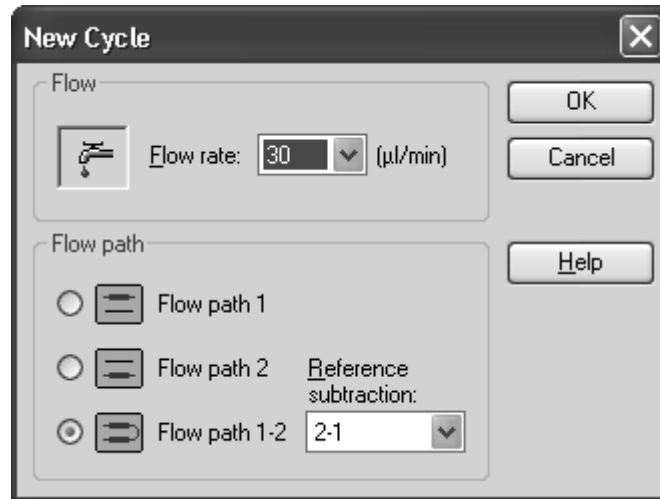
（再生溶液添加後の結合量の確認）

View → Reference Line をクリックします。

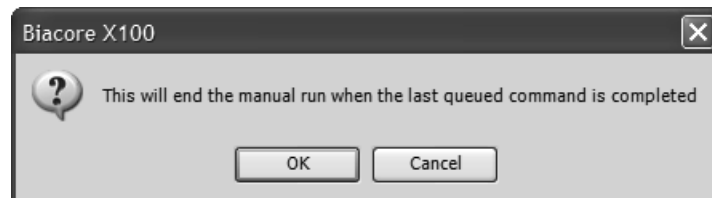
↓

リファレンスラインの縦軸を、左ボタンのドラッグでアナライト添加前に移動させ、**View** → **Baseline** をクリックします。リファレンスラインウィンドウの RU が 0 になります。

↓

再生溶液添加後に、リファレンスラインの縦軸を左ボタンのドラッグで移動し、再生後のアナライト残存量を確認します。

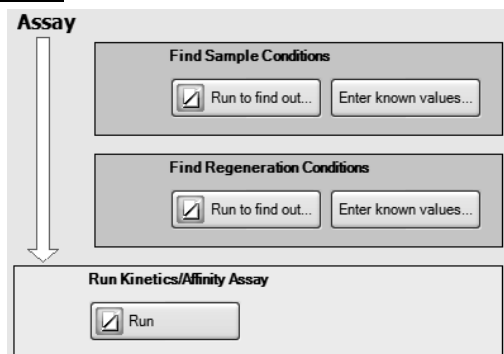
<u>新規サイクルへの変更</u>

New Cycle...アイコン もしくは、メニューバーの **Commands** → **New Cycle...**をクリックします。

流速、Flow path の設定を確認後、**OK** をクリックします。
測定サイクルが切り替わります。

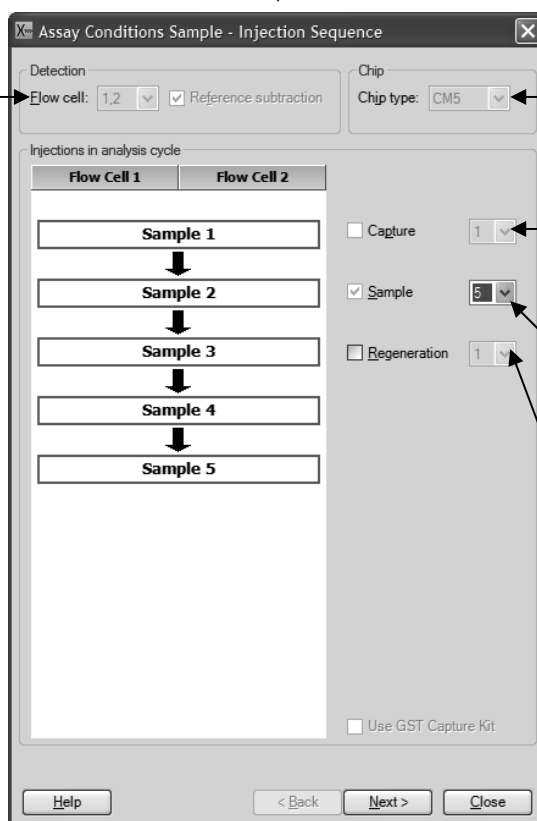
<u>測定の終了</u>

End manual run アイコン またはメニューバーの **Run** → **Stop Run...**をクリックします。

OK をクリックします。指定したコマンドをすべて実行した後に、システムは **Standby** 状態になります。

4-4-2. ウィザード測定による検討

アナライトの添加条件の検討

ワークフローシートの **Find Sample Conditions** → **Run to find out...**をクリックします（すでに条件が決まっている場合には、**Enter known values...**をクリックして、条件を入力します）。

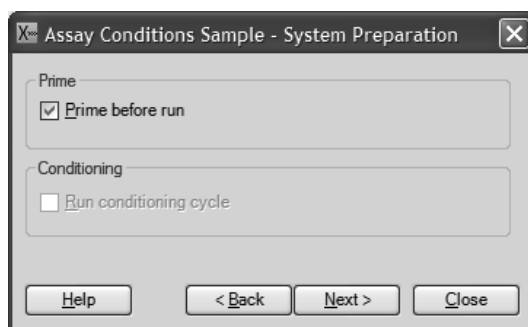
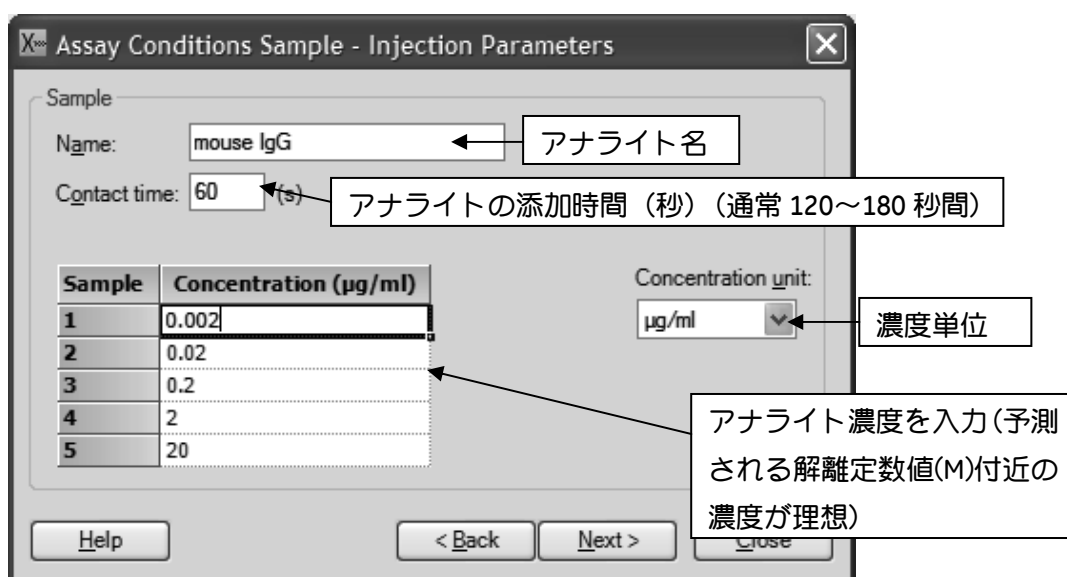
↓

フローセル 1,2 と、**Reference subtraction** が自動選択されている（リファレンスセル（フローセル 1）と固定化セル（フローセル 2）の差し引きセンサーグラムがリアルタイムに表示されます）

ワークフローで指定したセンサーチップが自動選択されます

キャプチャー法でリガンドを固定化する場合は、チェックを入れます

最大 5 アナライトの添加が可能

チェックを入れると、相互作用検討後に再生溶液を添加することができます（はじめて相互作用の検討を行う際は、次の **Find Regeneration Step** で検討を行うことをおすすめします）

Next>をクリックします。

↓

Prime before run　　　　測定前に **Prime** を実行する場合は、チェックします。

Next>をクリックします。

↓

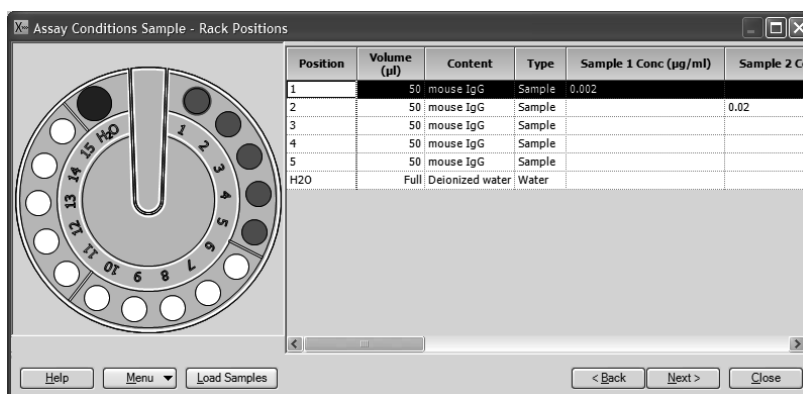
Next>をクリックします。

↓

Rack Positions ダイアログが表示されます。テーブルにしたがいアナライトをラックにセットします。**Next>**をクリックします。

↓

確認画面が表示されます。確認後、**Start** をクリックします。

↓

結果の保存先とファイル名を指定後、**Save** をクリックします。測定を中断する場合は、補足 4-2.（95 ページ）を参照してください。

↓

↓

測定が終了後、**Results** ダイアログが表示されます。システムは **Standby** 状態になります。
レポートポイントテーブルで結合量の確認を行います。
Next>をクリックします。

↓

Save Settings ダイアログが表示されます。
測定結果を考慮し、添加時間、解離時間、最大濃度、再生の必要性を決定します。
Save をクリックします。

↓

ワークフローシートの、**Assay→Find Sample Conditions** の **Run to find out...**に（　）が入ります。**Overview** にアナライト添加時間と解離時間、最大濃度などが表示されます。

再生条件の検討

Find Regeneration Conditions → **Run to find out...**をクリックします（すでに条件が決まっている場合は、**Enter known values...**をクリックして、条件を入力します）。

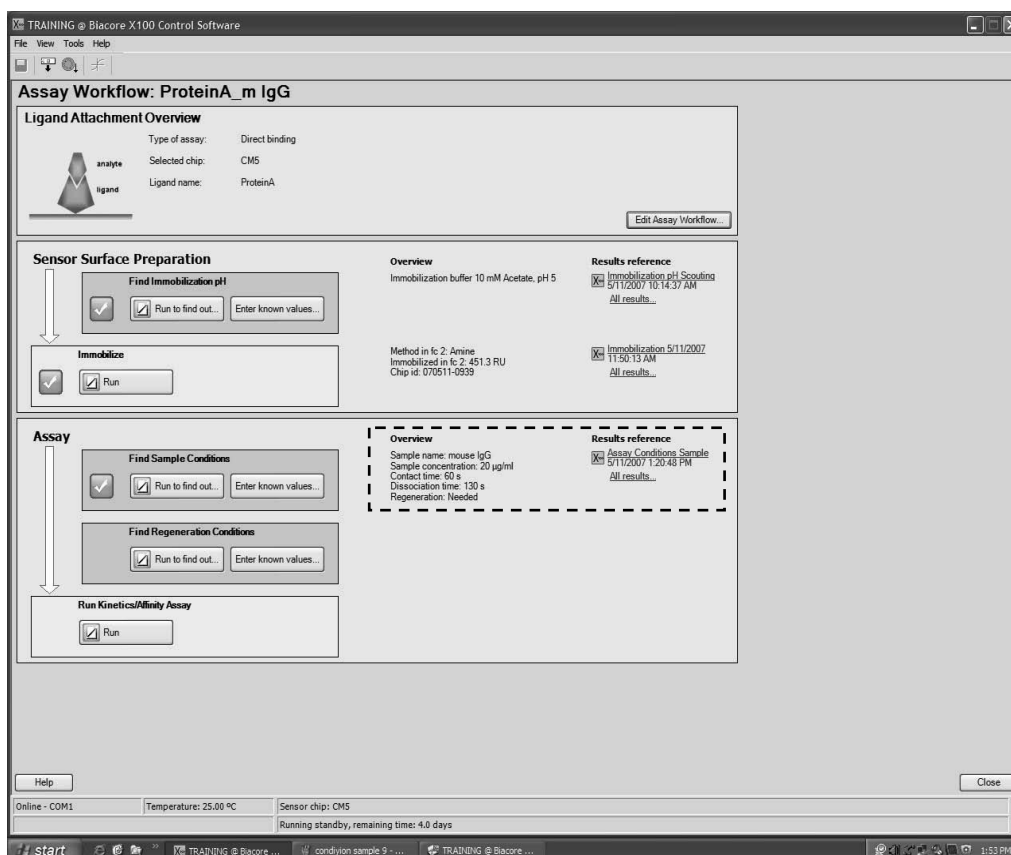
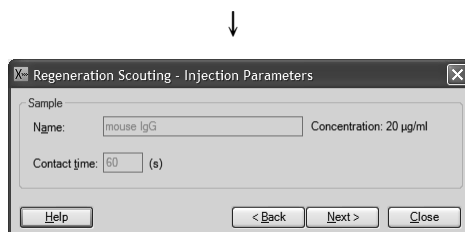
↓

Next>をクリックします。

↓

Prime before run　　　測定前に **Prime** を実行する場合は、チェックを入れます。

Next>をクリックします。

↓

Injection Parameters ダイアログが表示されます。

Sample の各項目は、**Find Sample Conditions** で保存した条件が自動入力されます。

（変更を行う場合は、**Find Sample Conditions** の **Enter known values...**をクリックして、条件を入力します）

Next>をクリックします。

↓

Experimental Parameters ダイアログが表示されます。

Regeneration parameters・・・

Stabilization period:　アナライト添加前のベースラインの安定化時間（秒）

Experimental design・・・

Lock:　Solutions のみにチェックを入れると、1 種類の再生溶液について、添加時間を変更した検討が可能。
Contact time のみにチェックを入れると、複数種類の再生溶液について、一定の添加時間で検討が可能。
Solutions および Contact time のチェックを入れると、1 種類の再生溶液について、一定の添加時間で検討。
Solutions および Contact time のチェックを外すと、再生溶液の種類および添加時間を個別に検討可能。

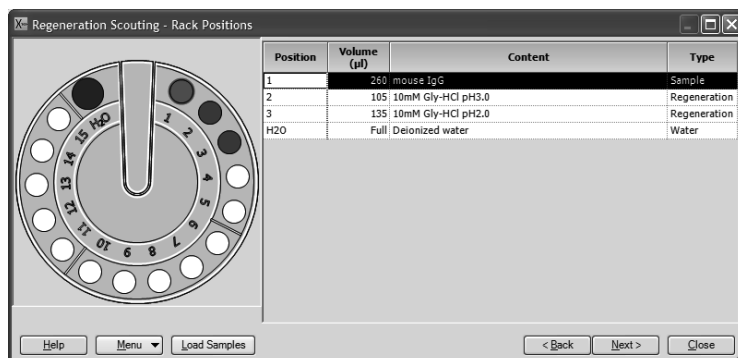
Number of conditions:　再生溶液の種類の数を選択します。7 種類まで選択可能。

Number of cycles for each conditions:
各再生溶液を用いた相互作用測定のくり返しサイクル数。5 サイクルまで選択可能。

Settings・・・

Regeneration solution　再生溶液名

Contact time(s)　再生溶液添加時間（秒）

再生溶液を 2 回添加する場合には、Regeneration solution1 および 2、Contact times 1 および 2 のカラムが表示されます。

Next>をクリックします。

↓

Rack Positions ダイアログが表示されます。テーブルにしたがいサンプルをラックにセットします。Next>をクリックします。

↓

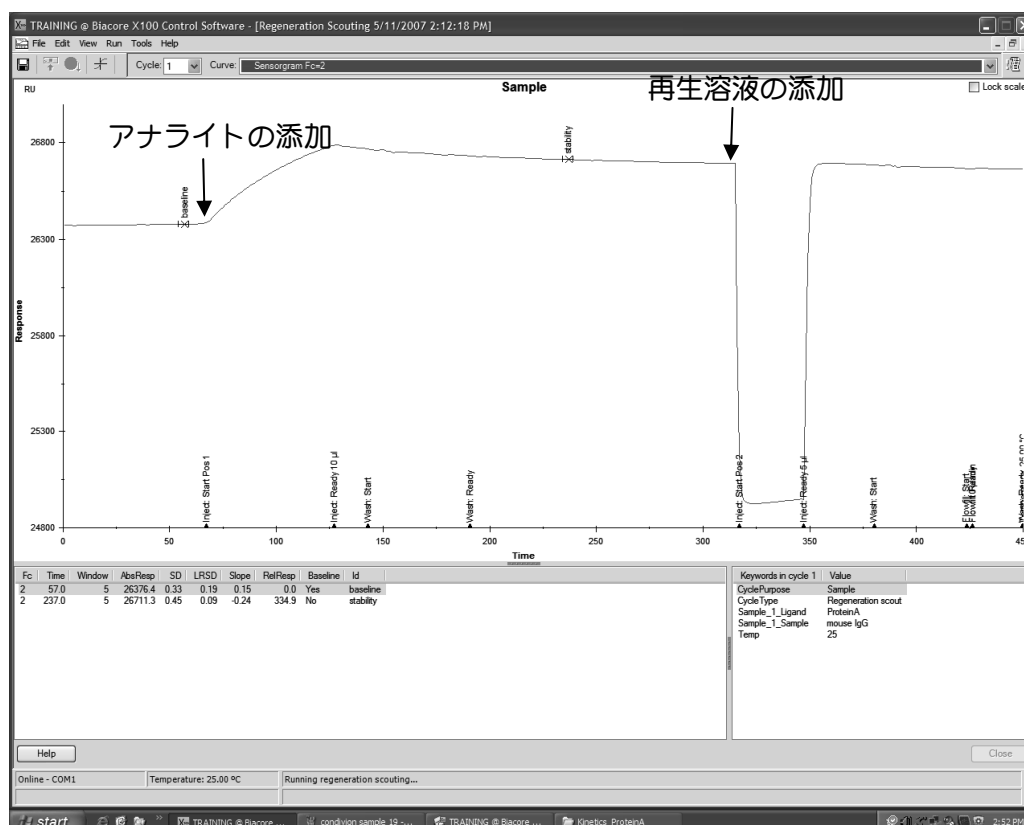
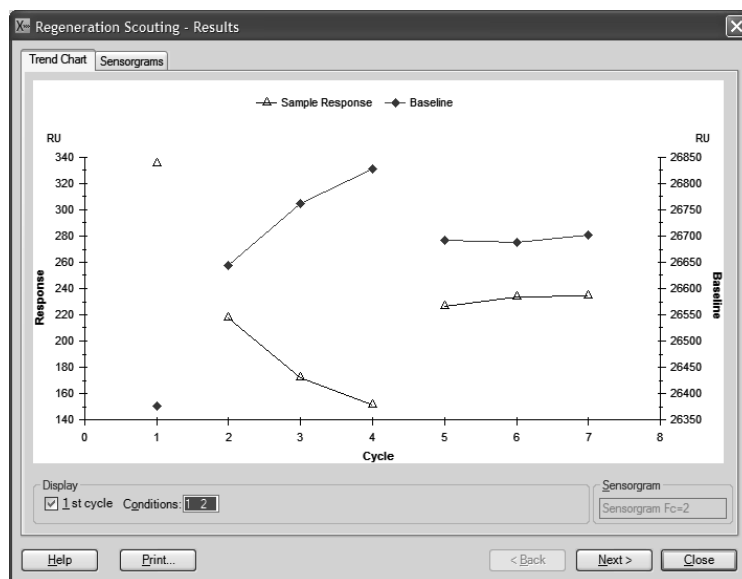
確認画面が表示されます。確認後、Start をクリックします。

↓

結果の保存先とファイル名を指定後、Save をクリックします。測定を中断する場合は、補足 4-2.（95 ページ）を参照してください。

↓

アナライト添加と再生溶液添加を 1 サイクルとして、指定したサイクル数実行します。

↓

測定が終了後、**Result** ダイアログが表示されます。システムは **Standby** 状態になります。

●**Trend Chart** タブ

Response　　アナライトの結合量のプロット

Baseline　　再生後のベースラインのプロット

Display・・・　　1st cycle のチェックを外すと、1 サイクル目のデータが消えます。

Conditions:　　結果の抽出が行えます。

評価方法；

横軸は、サイクルナンバー、左の縦軸は、"Sample Response"（アナライトの結合量）、右の縦軸は"Baseline"（ベースラインの高さ）の RU を表しています。1 サイクル目の Sample Response と Baseline の高さは、再生条件を検討する前の値です。上記結果は、2 サイクル目から 4 サイクル目が、1 つめの再生条件の検討結果を表しています。Baseline プロットが右肩上がりで、Sample Response プロットが右肩下がりになっていることから、アナライトの結合が完全に解離していない様子を表します。5 サイクル目から 7 サイクル目が、2 つめの再生条件を検討した結果です。Sample Response プロットも Baseline プロットも、5 サイクル目のレスポンスが、2 サイクル目のレスポンスと同様の値であり、7 サイクル目まで安定してプロットされていることから、結合したアナライトが解離し、かつ再現性よく結合が見られていることを示します。よって、2 つめに検討した再生条件が至適条件と言えます。

●**Sensorgrams** タブ

Display・・・　　　　選択しているセンサーグラムの重ね書きが表示されます。

Cycles:　　　　　　　測定サイクルの抽出が行えます。

適当な再生条件が見つかれば、**Next>**をクリックします。

（適当な再生条件が見つからない場合は、**Close** をクリックし、再度、再生条件について検討しなおします）

↓

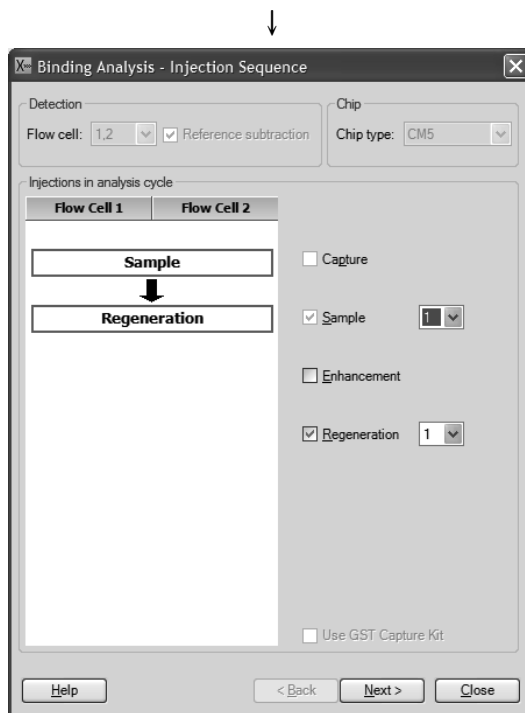
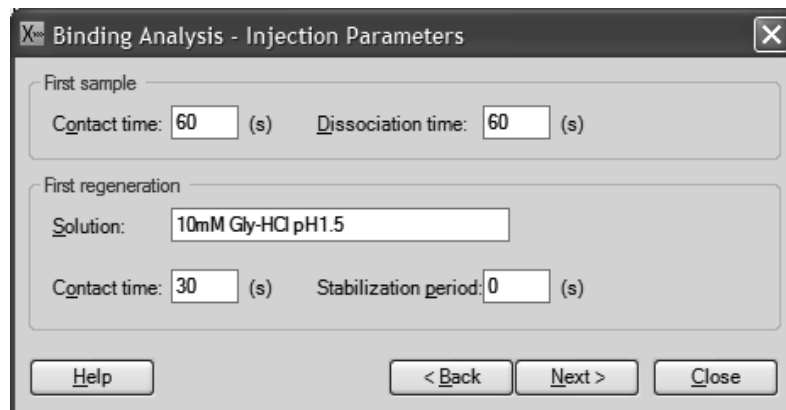
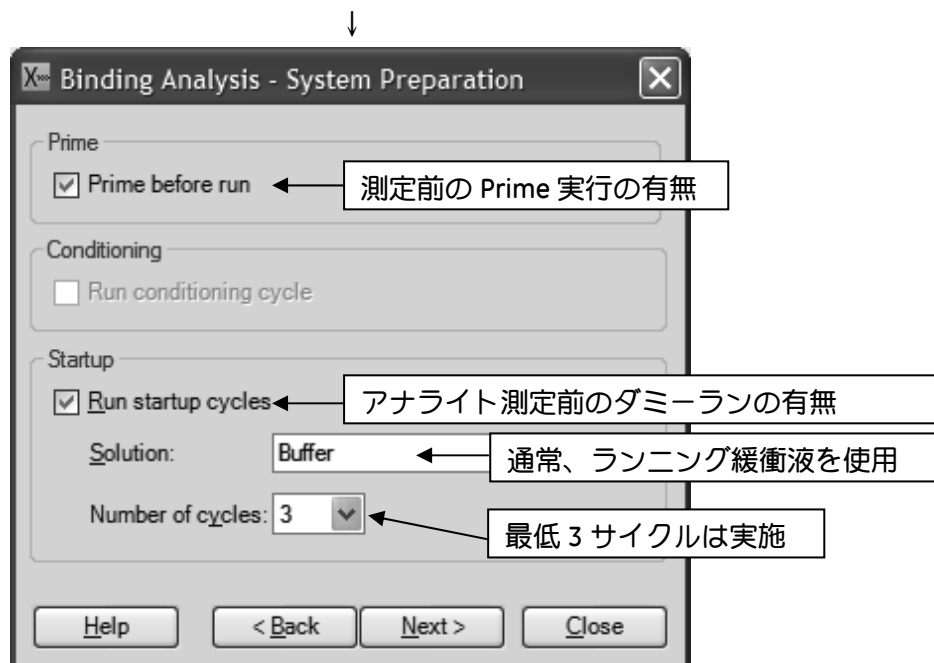
Save をクリックします。保存条件が最終測定プログラムに反映されます。

↓

ワークフローシートの、Assay → Find Regeneration Conditions の Run to find out...に（　）が入ります。Overview に再生溶液名、添加時間などが表示されます。

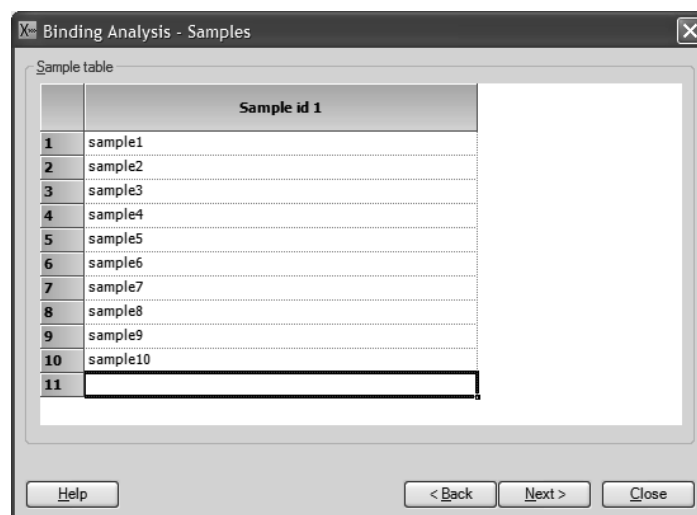
4-5. 測定および解析

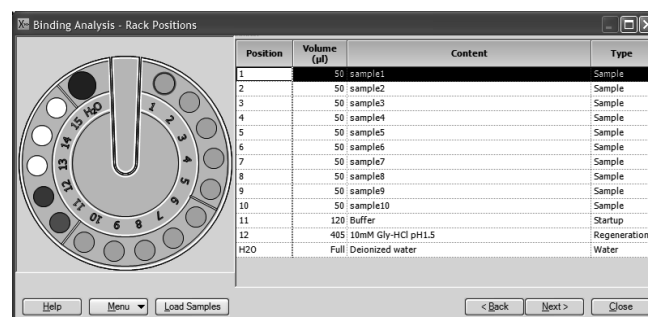
Run Binding Analysis Assay → Run をクリックします。

↓

Injection Sequence ダイアログが表示されます。ワークフローで決定した条件が自動選択されています。この画面での変更は不可能です。

Next>をクリックします。

↓

Next>をクリックします。

↓

Injection Parameters ダイアログが表示されます。ワークフローからウィザードで条件を検討し、決定した場合は、自動入力されています。

Next>をクリックします。

↓

Sample ダイアログが表示されます。**Sample id** に各アナライト名を入力します。

↓

Rack Positions ダイアログが表示されます。テーブルにしたがいサンプルをラックにセットします。

Next>をクリックします。

↓

確認画面が表示されます。確認後、**Start** をクリックします。

↓

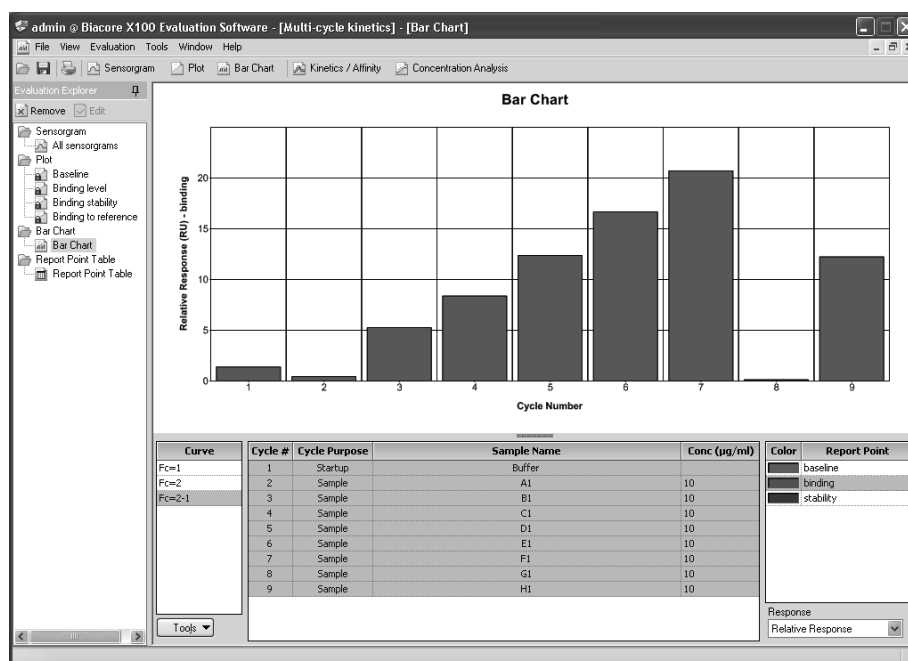
結果の保存先とファイル名を指定後、**Save** をクリックします。測定を中断する場合は、補足 4-2.（95 ページ）を参照してください。

↓

測定が終了すると、システムは **Standby** 状態になります。**Standby** の終了方法は、2-1-4.（22 ページ）を参照してください。取得データは自動保存され、Biacore X100 Evaluation Software が立ち上がり、取得データが開きます。

↓

ツールバーの Bar Chart をクリックします。

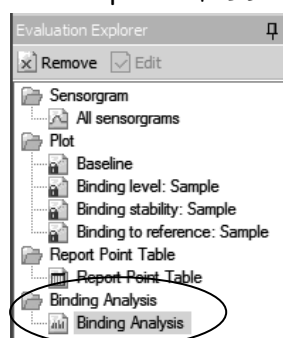
↓

Bar Chart ダイアログが表示されます。

全測定サイクル分について、アナライト（ダミーランによる緩衝液添加を含みます）添加終了直前の結合レスポンスの棒グラフとテーブルが表示されます。

必要に応じて、サンプルテーブルで表示するアナライトを選択します。ポインターをクリック＆ドラッグして選択するか、キーボードの[Ctrl]キーを押した状態でセルをクリックします。

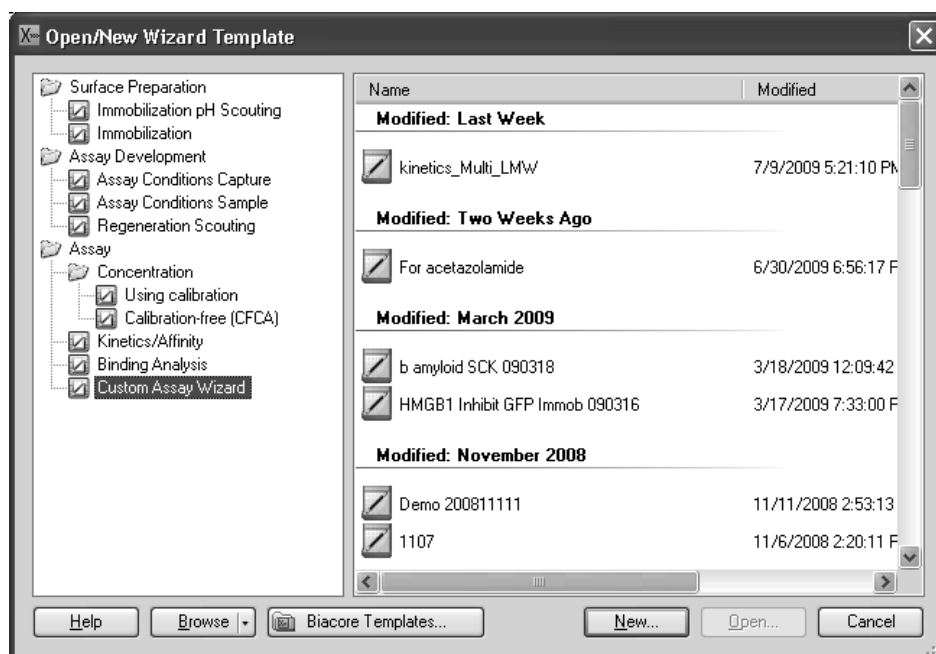
Cycle #	Sample Name	Conc (µM)
1	Buffer	
2	Buffer	
3	Buffer	
4	sample1	
5	sample2	
6	sample3	
7	sample4	
8	sample5	
9	sample6	
10	sample7	
11	sample8	
12	sample9	

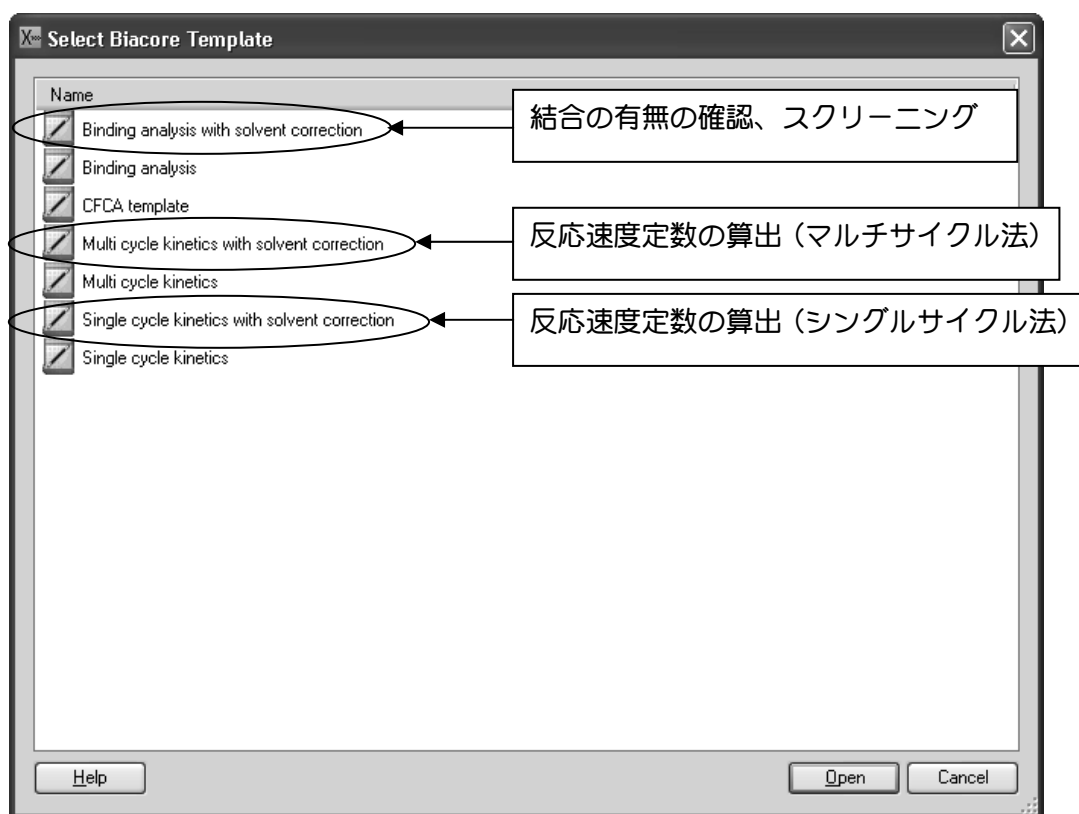
↓

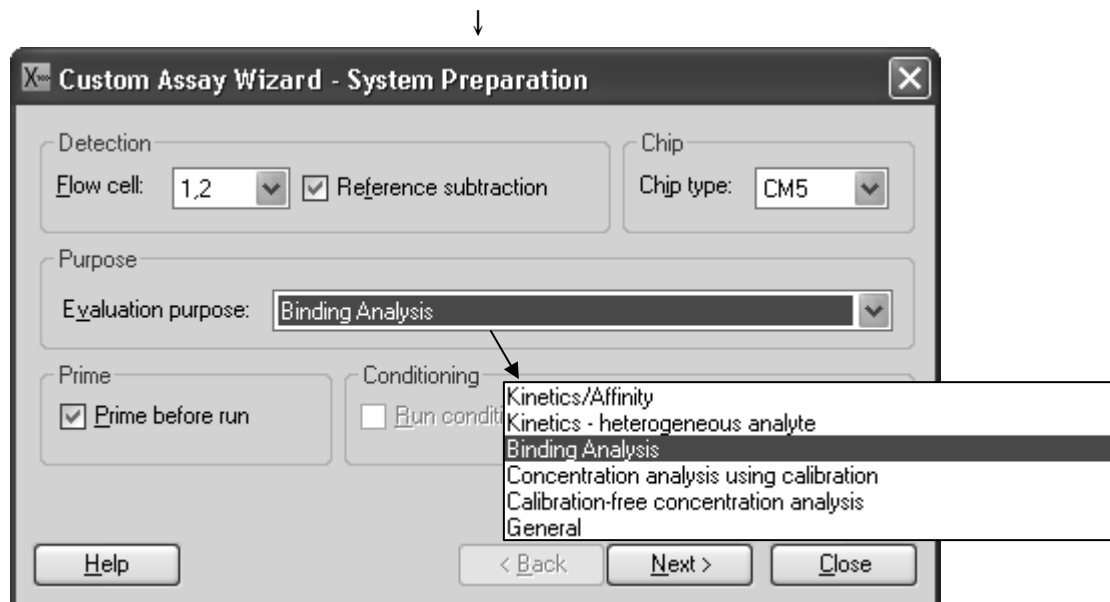
上記解析結果は、画面左端の Evaluation Explorer 中のフォルダに追加保存されます。

5. 低分子化合物アナライトの相互作用測定

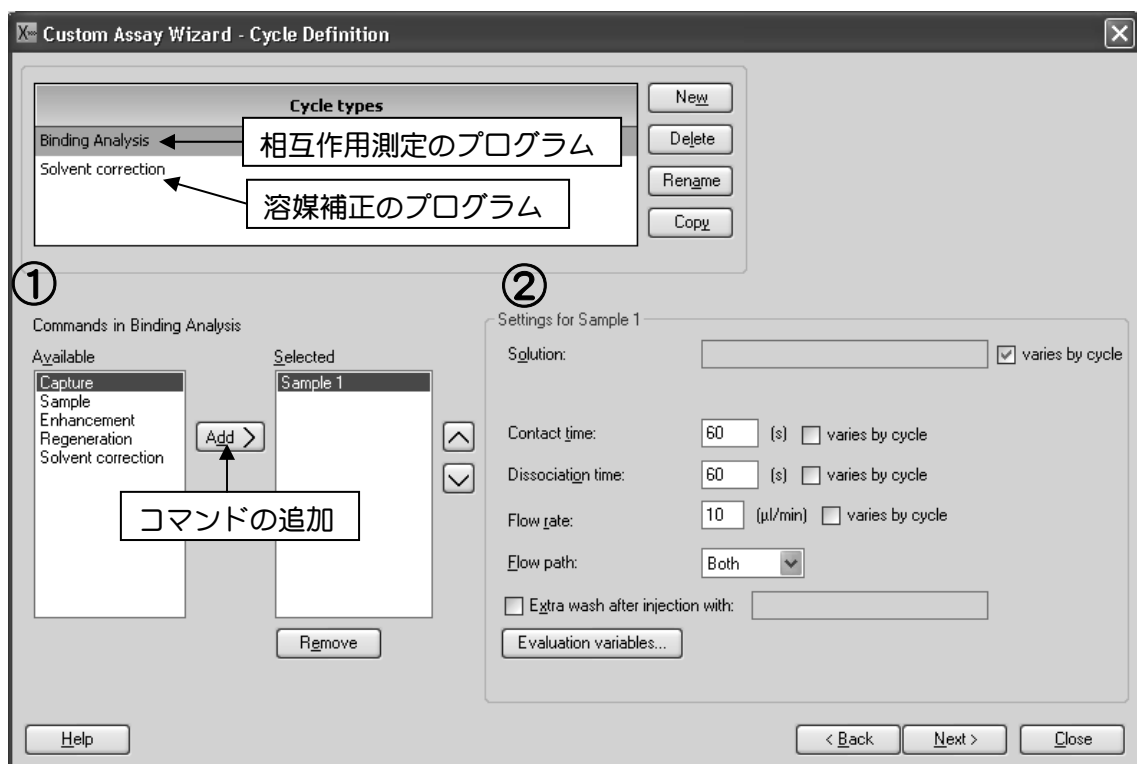
低分子化合物アナライトを用いて、相互作用測定を行う場合は、ワークフローに紐づけされていない、専用の測定ウィザードを用います。ワークフローを用いて、固定化まで実施し、ワークフローを閉じ、専用の測定ウィザードで相互作用測定を実施します。測定条件など詳細については、Ⅳ-ⅲ.（実験をはじめる前に　L ページ）を参照してください。

5-1. 測定

Other options → **Wizards...** をクリックします。

Custom Assay Wizard...をハイライトにすると、**Biacore Templates...**がアクティブになります。**Biacore Templates...**をクリックします。

↓

上記 3 つのウィザードが、低分子化合物アナライト測定用のプログラムです。
目的の測定プログラムをダブルクリック、もしくは測定プログラムを選択後、右下の Open ボタンを使って開きます。

↓

Evaluation purpose に、測定プログラムの内容を選択します。
Next>をクリックします。

↓

Cycle types の相互作用測定のプログラムをハイライトにします。①、②の画面で詳細を設定します。

結合の有無の確認、スクリーニングの場合（Binding analysis）

①Commands in ....画面

キャプチャーや再生など、サンプル添加以外のコマンドが必要であれば、Add ボタンにて追加します。

②Settings for ....画面

サンプル添加条件；

Contact time; 30～60 (s)

Dissociation time; 30～60 (s)

Flowrate; 10 (µl/min)

反応速度定数の算出の場合（Multi cycle kinetics, Single cycle kinetics）

①Commands in ....画面

キャプチャーや再生など、サンプル添加以外のコマンドが必要であれば、Add ボタンにて追加します。

②Settings for ....画面

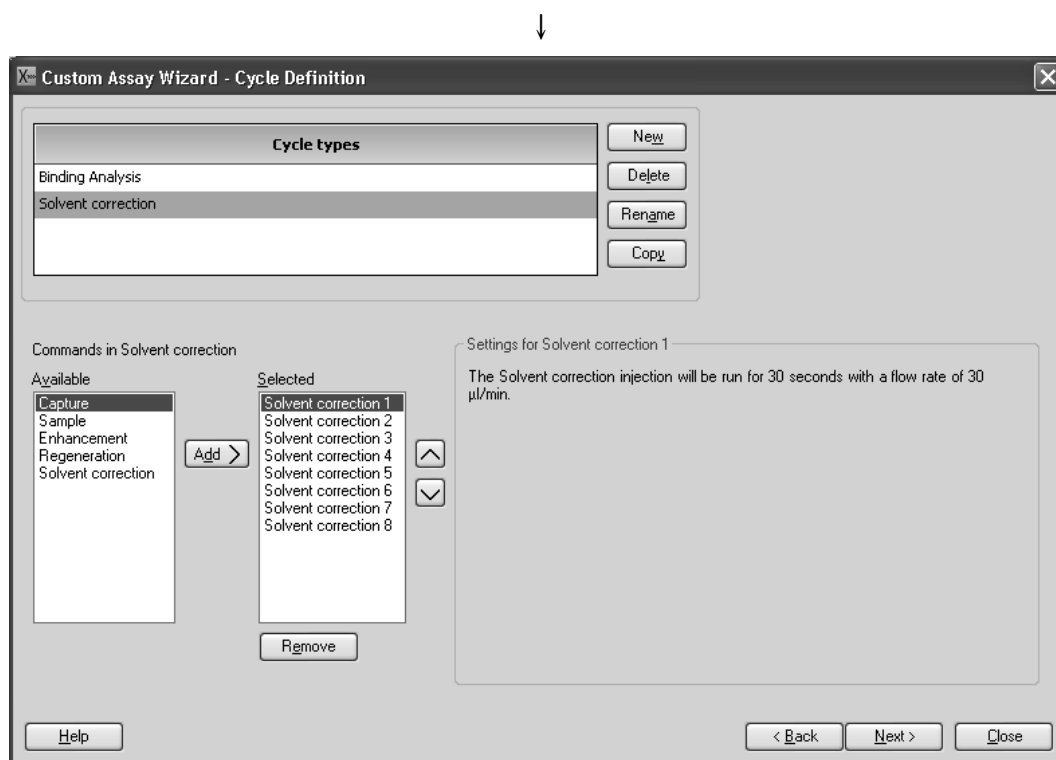
サンプル測定条件；

Contact time; 120～180 (s)

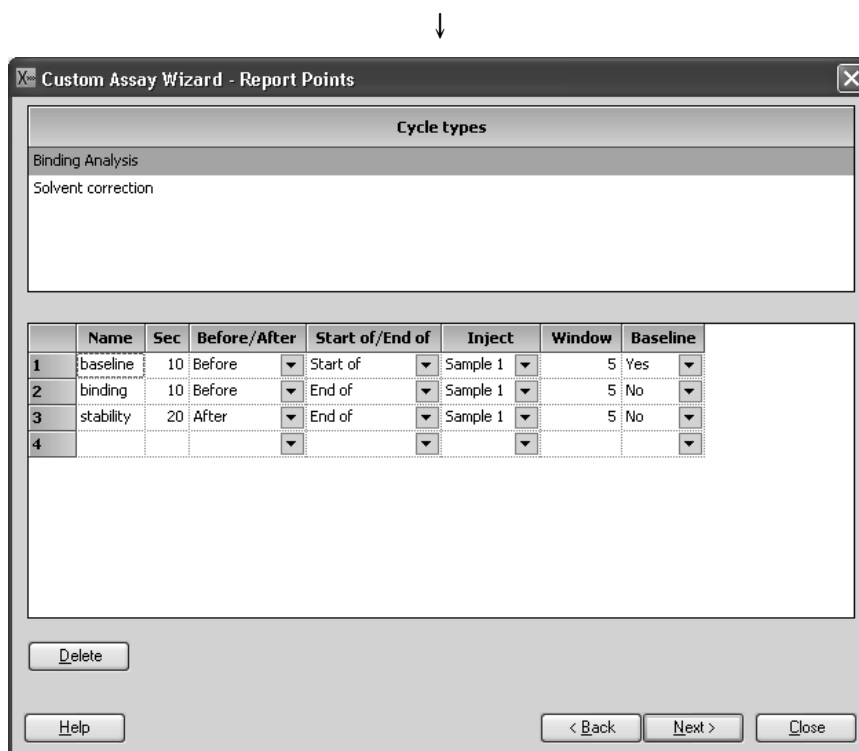
Dissociation time; 120～180 (s)

Flowrate; 30 (µl/min)

Cycle types の solvent correction をハイライトにします。

↓

溶媒補正のプログラムが表示されます。

Next>をクリックします。

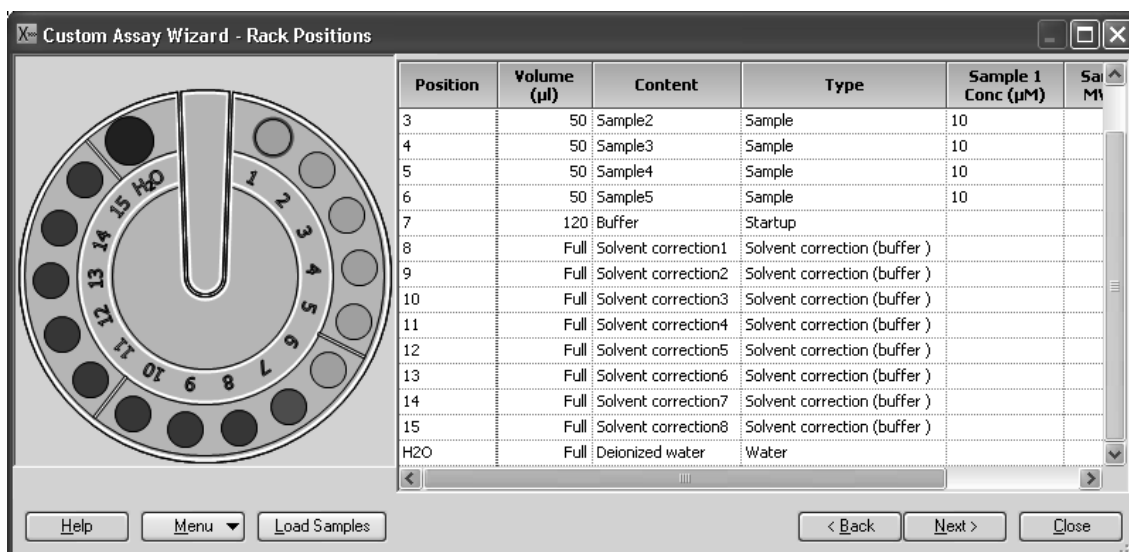
↓

レポートポイントの記録設定が表示されます。

Next>をクリックします。

↓

サンプル名、濃度、分子量を入力します。シングルサイクルカイネティクスの場合、濃度のカラムが右側に 5 つ並び、濃度が低い方から順に入力します。

Next>をクリックします。

↓

Rack Positions ダイアログが表示されます。テーブルにしたがい、サンプルなどをラックにセットします。

Next>をクリックします。

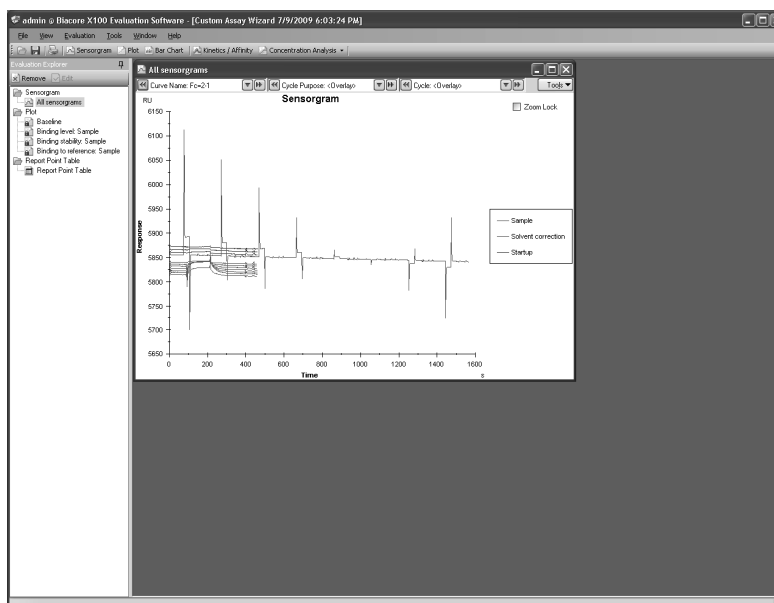
↓

確認画面が表示されます。確認後、Start をクリックします。

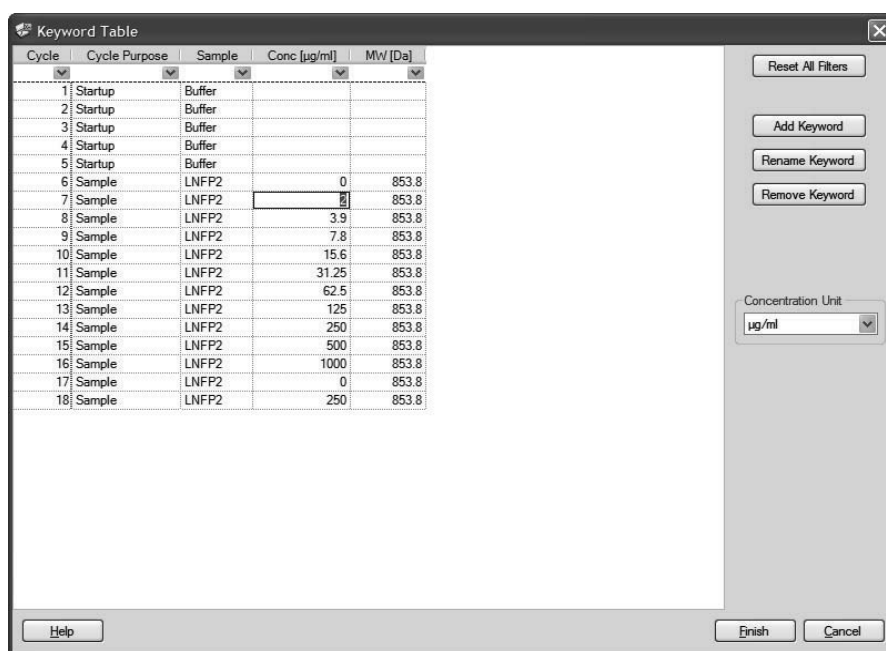
↓

結果の保存先とファイル名を指定後、Save をクリックします。測定を中断する場合は、Run → Stop Run...をクリックします。

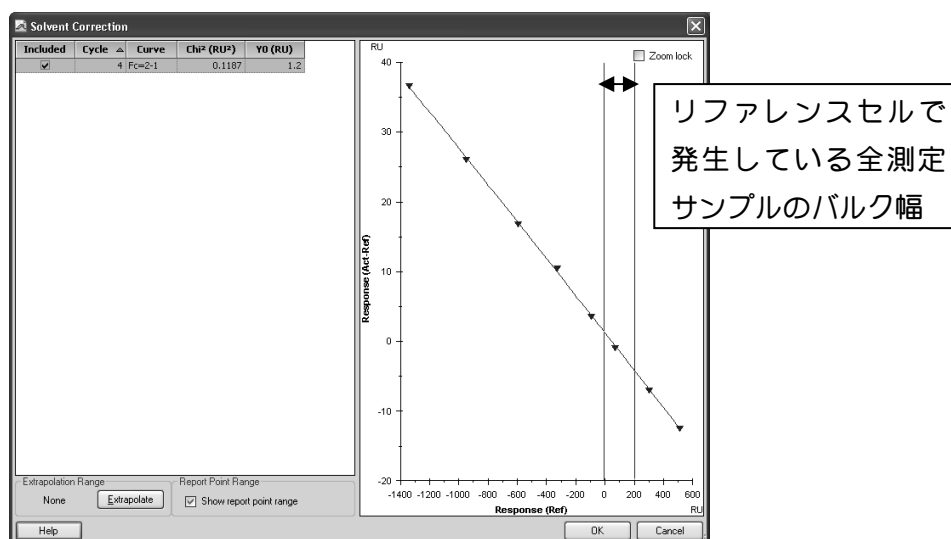
↓

測定が終了すると、システムは Standby 状態になります。Standby の終了方法は、2-1-4.（22 ページ）を参照してください。取得データは自動保存され、Biacore X100 Evaluation Software が立ち上がり、取得データが開きます。

5-2. データ解析

補足 5-1. アナライト情報の変更

アナライト濃度、濃度単位、アナライト名などの入力ミスがあった場合は、**Keyword Table** から入力を変更します。**Tools…** → **Keyword Table…**をクリックします。

目的のセルをクリックして、変更を行います。

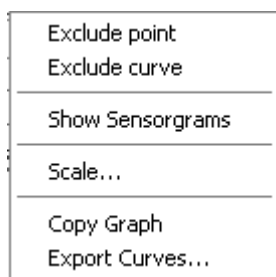
溶媒補正

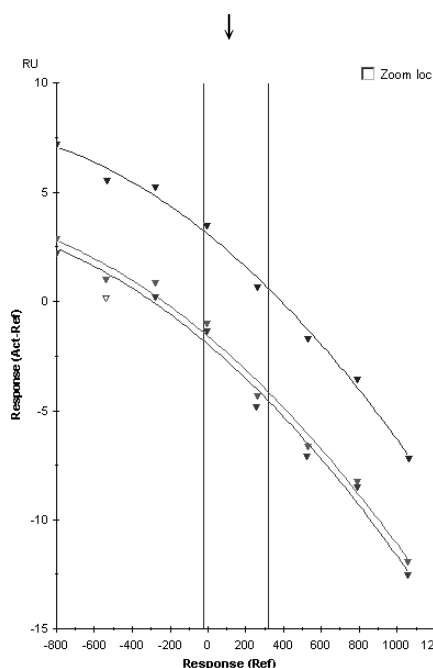
Evaluation → Add Solvent correction…をクリックします。
測定サイクル中の溶媒補正曲線が表示されます。

OK をクリックすると補正が完了します。

溶媒補正曲線は、Evaluation Explorer 中のフォルダに追加保存されます。

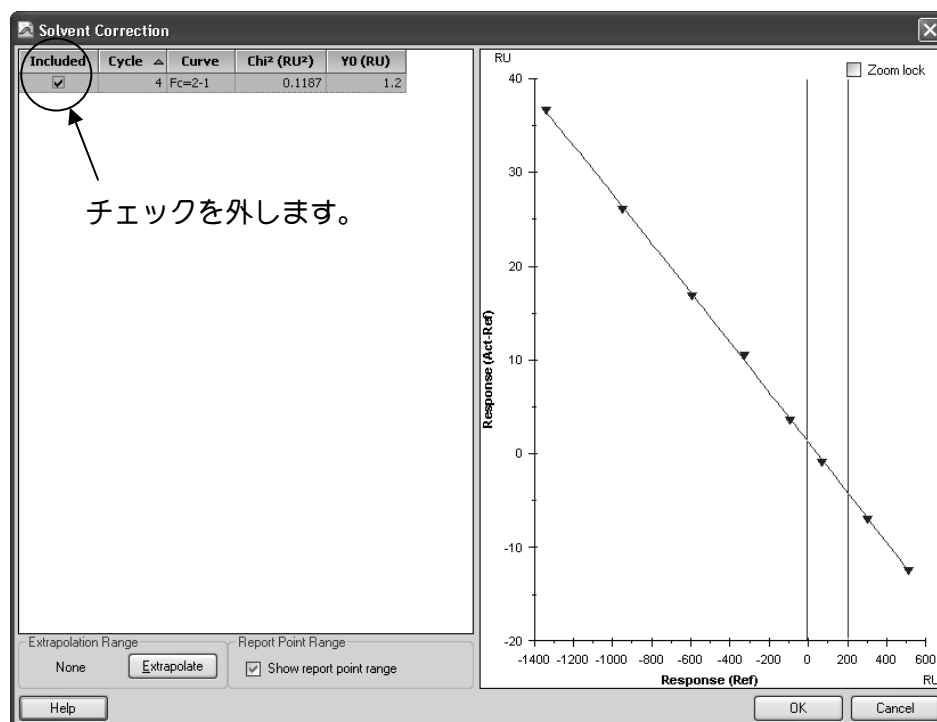
溶媒補正後、結合の有無の確認が目的の場合は、分子量補正（138 ページ）を行った結果を評価します。反応速度定数の算出の目的の場合は、72 ページのデータ解析を参考にしてください。

補足 5-2. 測定ポイントの削除

エアーの混入などの理由で、溶媒補正曲線から削除したい測定ポイントがある場合は、その測定ポイント上にカーソルを移動し、マウスを右クリックします。

Exclude point をクリックします。

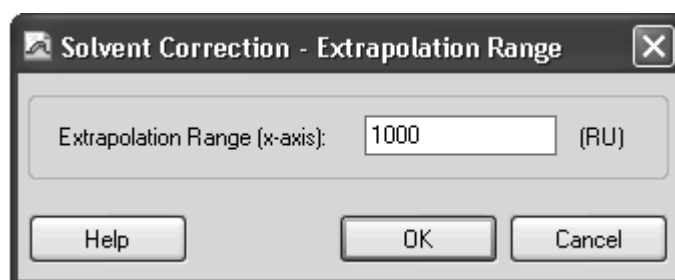
↓

測定ポイントが削除されます。同時に、改めて残りの測定ポイントで溶媒補正曲線が作成されます。

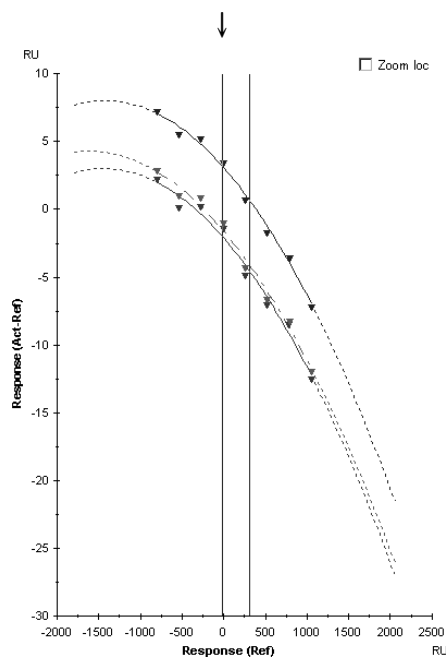
補足 5-3. 溶媒補正曲線の削除

エアーの添加などの理由で解析から削除したい溶媒補正曲線がある場合、目的の溶媒補正曲線について、**Solvent correction** 左のボックスの **Include** カラムのチェックを外すと、溶媒補正曲線は削除されます。

補足 5-4. 溶媒補正曲線の延長

サンプルもしくは溶媒補正用 DMSO 溶液の調製の問題で、測定サンプルのバルクレスポンスが溶媒補正用 DMSO 溶液の範囲内に収まらなかった場合に、溶媒補正用 DMSO 溶液の濃度幅（＝リファレンスセルに対するバルク幅）を広げることができます。ただし、延長された溶媒補正曲線の領域での補正は、実測値とは異なるため、結果の評価には注意が必要です。

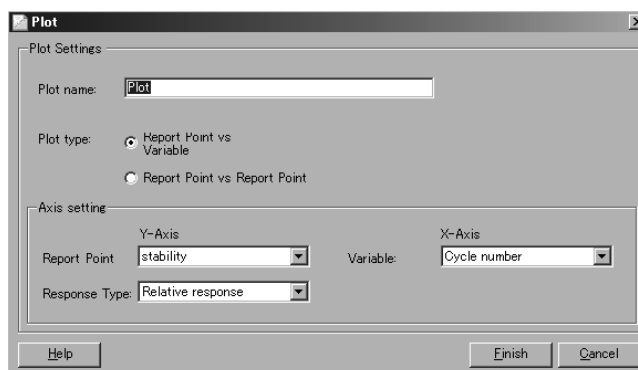
Solvent correction 左下の **Extrapolate** をクリックします。

↓

延長する幅を入力します。実際の溶媒補正用曲線の測定幅の 10% を超えないことが望ましいです。OK をクリックします。

↓

分子量補正

スクリーニングに合せて、おおよそのアフィニティーランキングをする場合は、分子量補正を行います。結合レスポンスを分子量で割り、さらに 100 を掛けた値を、補正値として評価します。

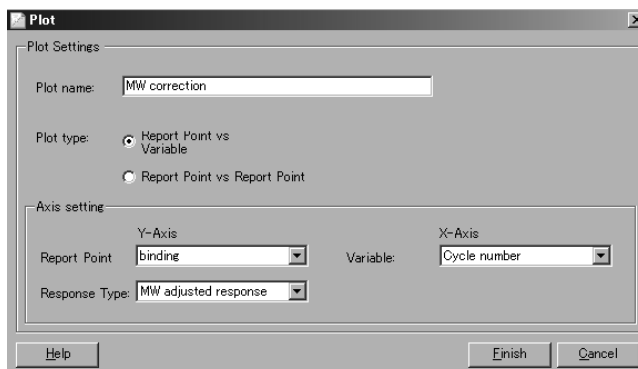
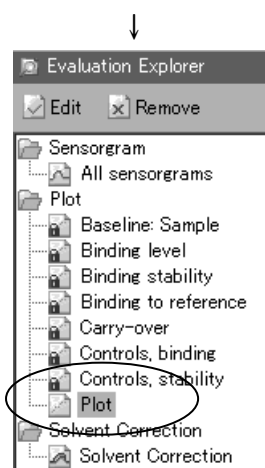
Evaluation → Add Plot...をクリックします。

↓

Plot name　プロットデータの名称（例；MW correction）

Plot type　プロット様式の設定（Report Point vs Variable）

Axis setting　Y 軸の設定（Report Point：binding、Response type：MW adjustedresponse）
X 軸の設定（Variable：Cycle number）

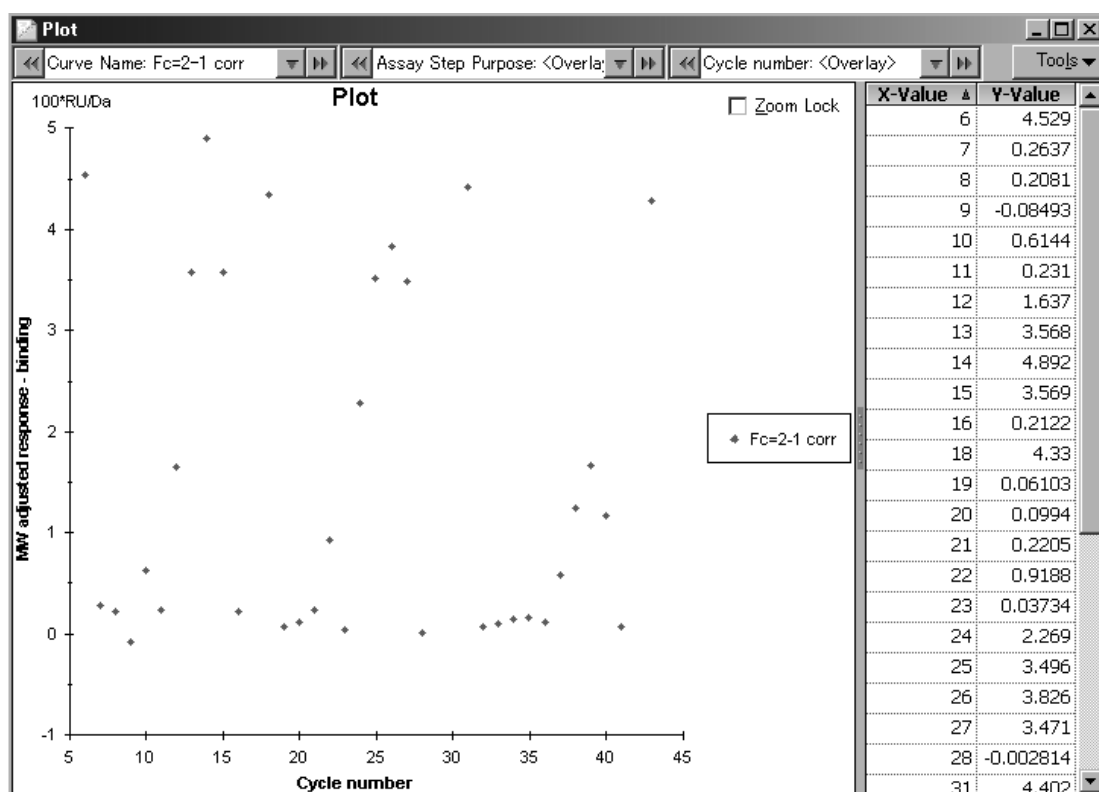
Finish をクリックします。

↓

Evaluation Explorer の **Plot** フォルダに反映されます。

ファイル名は、自動で **Plot** と入力されるので、任意に変更します。

Work area には、分子量補正されたデータが表示されます。

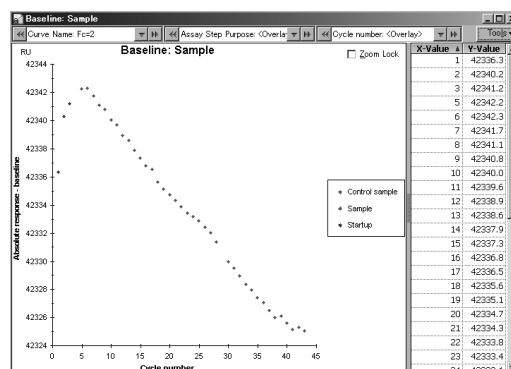
Y 軸の単位は、100×RU/Da に変更されています。

X-Value	Y-Value
6	4.529
7	0.2637
8	0.2081
9	-0.08493
10	0.6144
11	0.231
12	1.637
13	3.568
14	4.892
15	3.569
16	0.2122
18	4.33
19	0.06103
20	0.0994
21	0.2205
22	0.9188
23	0.03734
24	2.269
25	3.496
26	3.826
27	3.471
28	-0.002814
31	4.402

補足 5-5. 測定結果の正当性の評価

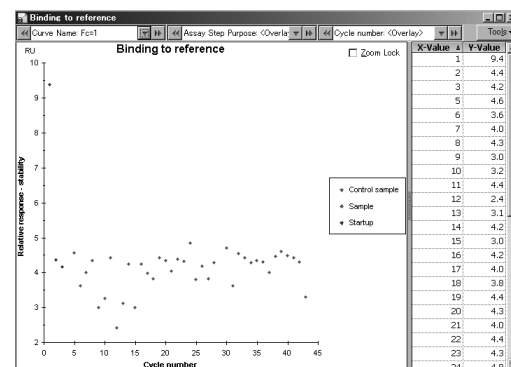
Evaluation Explorer の Plot を用いて、得られたデータの信頼性があるかどうかを評価します。

ベースラインの変動

Baseline: Sample プロット

全測定サイクルの baseline の絶対値に対するプロットが表示されます。物理吸着しているリガンドがサイクルごとに脱離している場合、右肩下がりになるが、ポジティブコントロールサンプルのレスポンスが確認できていればよいです。ポジティブコントロールがない場合、全サイクルの総変動量（RU）が固定化量の 10% 以上ある場合には、それを考慮して評価する必要があります。

リファレンスセルへの非特異吸着の確認

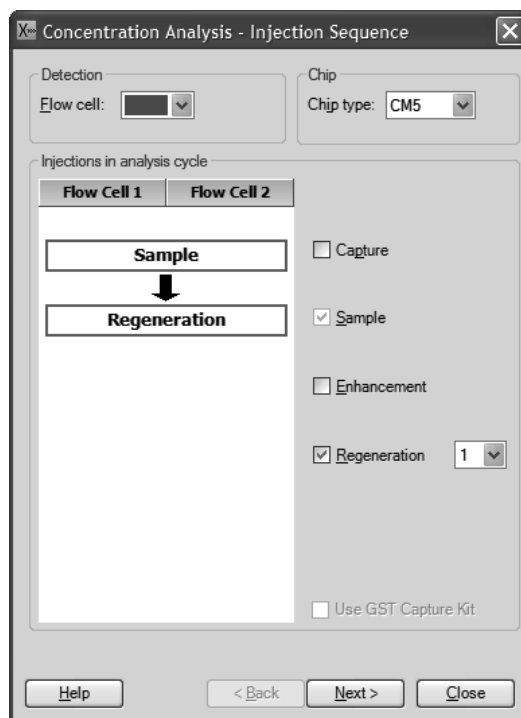
Binding to reference プロット

Stability の baseline に対する相対値のプロットが表示されます。ランニング緩衝液のレスポンスを基準として評価します。ランニング緩衝液のレスポンス以上あるサンプルは、センサーチップ表面へ非特異的に吸着しています。それを考慮し評価します。

6. 濃度測定

6-1. 濃度測定および解析

濃度測定は、Concentration Analysis ウィザードを使用します。対応するワークフローは存在しないが、再生条件の検討まではどの実験系も同じであるため、Binding Analysis…または Kinetics/Affinity…のワークフローを代用できます。ワークフローは、Overview で条件検討の結果を一覧で表示できるメリットがあります。濃度測定の概念は、Ⅳ-iv.（実験をはじめる前に P ページ）を参照してください。

Other options → **Wizards…** → **Concentration** → **Using Calibration** をクリックします。

↓

Injection Sequence ダイアログが表示されます。

Detection・・・

Flow cell :　リガンドが固定化されているフローセルを選択します。

Chip・・・

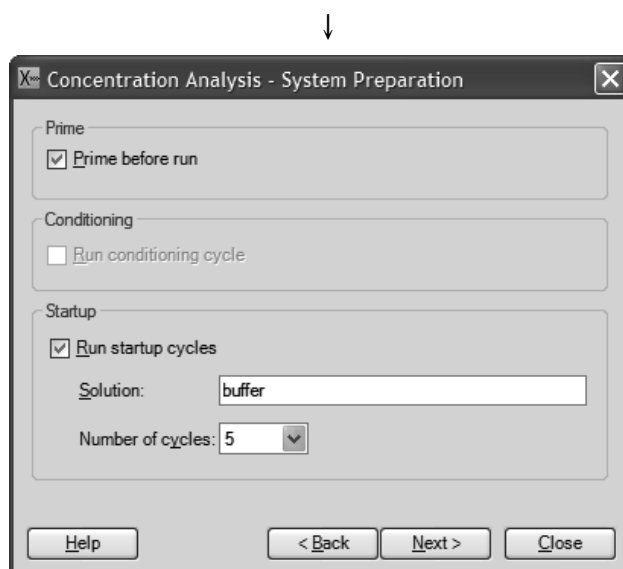
Chip type :　センサーチップの種類を選択します。

Injections in analysis cycle・・・

Capture ：　リガンドをキャプチャーする場合はチェックを入れます。

Enhancement :　アナライトの結合量が少なく､二次抗体などを添加して結合量を増幅する場合は、チェックを入れます。

Next>をクリックします。

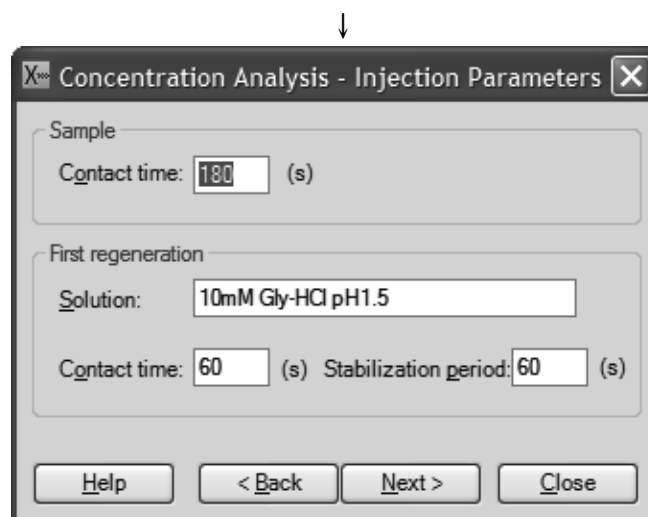
↓

Prime・・・

Prime before run : 測定前に Prime を実行する場合は、チェックを入れます。

Startup・・・

Run startup cycles : 測定前にダミーランを実行する場合は、チェックを入れます。少なくとも、3 回は、ランニング緩衝液にて実施します。

Next>をクリックします。

↓

Injection Parameters ダイアログが表示されます。下記項目について入力します。

Sample・・・

Contact time: アナライト添加時間（秒）

First regeneration・・・

Solution: 再生溶液名

Contact time: 再生溶液添加時間（秒）

Stabilization period： 再生溶液添加後のベースライン安定化時間（秒）

Next>をクリックします。

↓

Calibration Curve ダイアログが表示されます。下記項目について入力します。

Calibration Curve ・・・

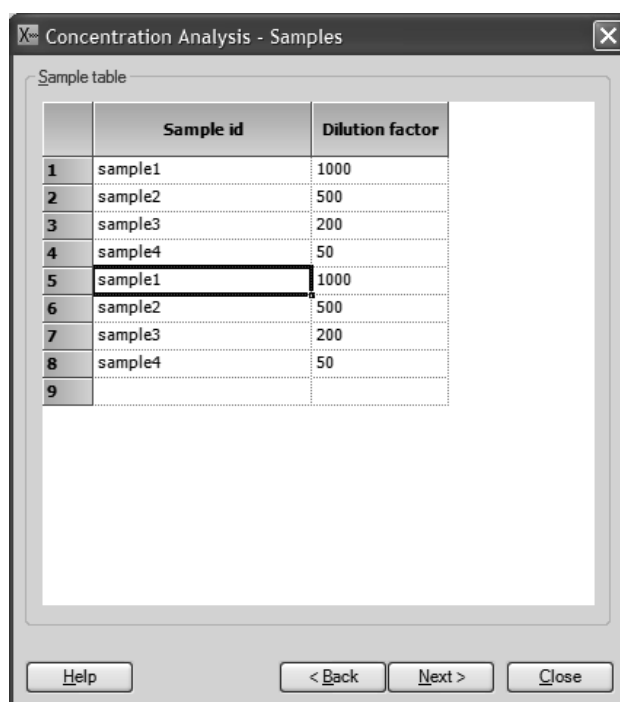
Analyte name:　　検量線用アナライト（濃度既知標準サンプル）名

Calibration points・・・

Concentration :　　検量線用アナライトの濃度を、少なくとも 6 濃度以上入力します。
をクリックすると、濃度単位の変更が可能です。
検量線を複数作成する場合は、テーブルの濃度系列をドラックして選択し、コピー、ペーストします。テーブルに入力した順番で測定されます。

Next>をクリックします。

↓

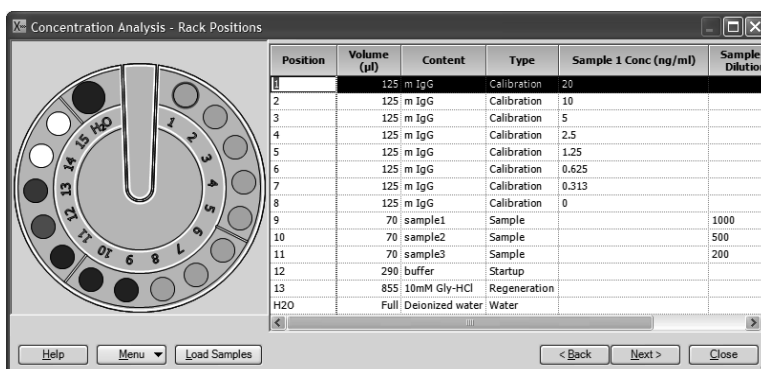
	Sample id	Dilution factor
1	sample1	1000
2	sample2	500
3	sample3	200
4	sample4	50
5	sample1	1000
6	sample2	500
7	sample3	200
8	sample4	50
9		

Samples ダイアログが表示されます。下記項目について入力します。

Sample table・・・

Sample id :　アナライト（濃度未知サンプル）名

Dilution factor :　アナライト希釈倍率

同一アナライトについて、くり返し測定を行う場合は、測定回数分入力します。検量線用アナライトの測定後に、テーブルに入力した順番で測定を行います。

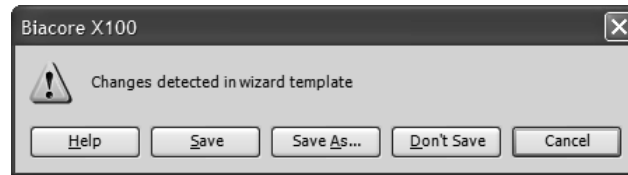
Next>をクリックします。

↓

Position	Volume (µl)	Content	Type	Sample 1 Conc (ng/ml)	Sample Dilutio
1	125	m IgG	Calibration	20	
2	125	m IgG	Calibration	10	
3	125	m IgG	Calibration	5	
4	125	m IgG	Calibration	2.5	
5	125	m IgG	Calibration	1.25	
6	125	m IgG	Calibration	0.625	
7	125	m IgG	Calibration	0.313	
8	125	m IgG	Calibration	0	
9	70	sample1	Sample		1000
10	70	sample2	Sample		500
11	70	sample3	Sample		200
12	290	buffer	Startup		
13	855	10mM Gly-HCl	Regeneration		
H2O	Full	Deionized water	Water		

Rack Positions ダイアログが表示されます。テーブルにしたがいサンプルをラックにセットします。**Next>**をクリックします。

↓

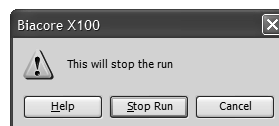
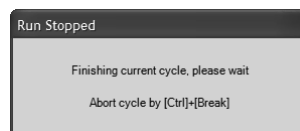
確認後、**Start** をクリックします。

↓

アナライト情報などを入力したウィザードをテンプレートとして保存する場合は、Save As...で名前をつけて保存を行います。保存しない場合は、Don't Save をクリックします。

↓

結果の保存先とファイル名を指定後、**Save** をクリックします。測定を中断する場合は、補足 6-1.を参照してください。

補足 6-1. 測定の中断

測定を中断する場合、ツールバーの **Run** → **Stop Run...**をクリックします。

↓

Biacore X100
This will stop the run
Help　Stop Run　Cancel

Stop Run をクリックします。

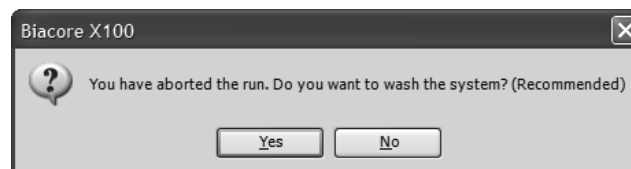
↓

Run Stopped
Finishing current cycle, please wait
Abort cycle by [Ctrl]+[Break]

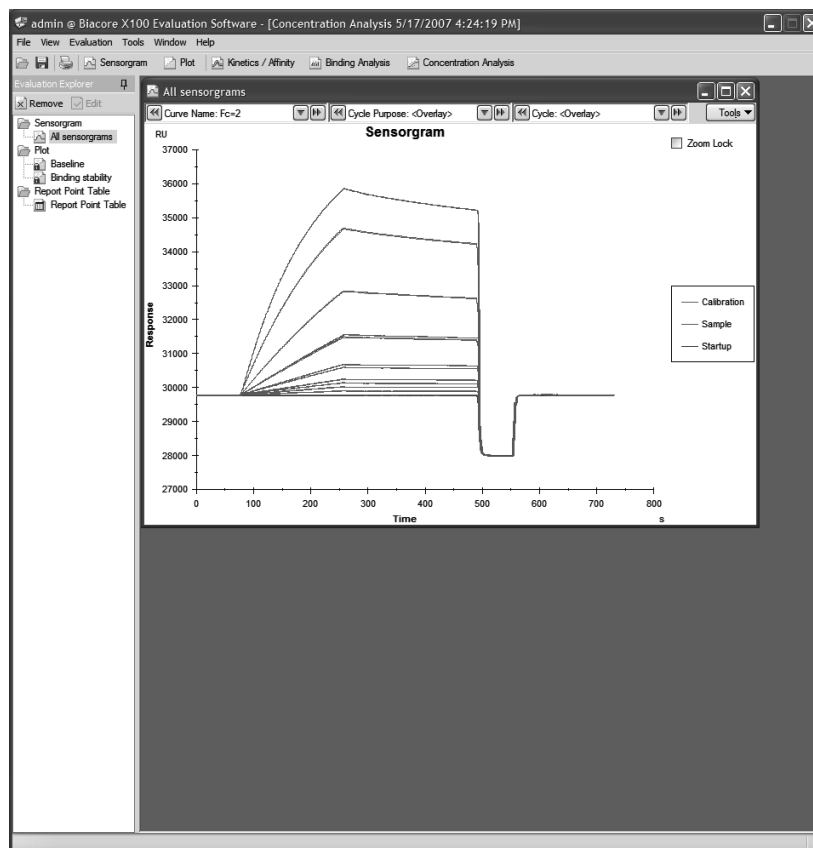
測定中サイクルの全コマンドを実行後、**Standby** 状態になります。

全コマンド実行を待たずに測定を中止したい場合には、キーボードの[Ctrl]キーと[Break]キーを同時に押します。

↓

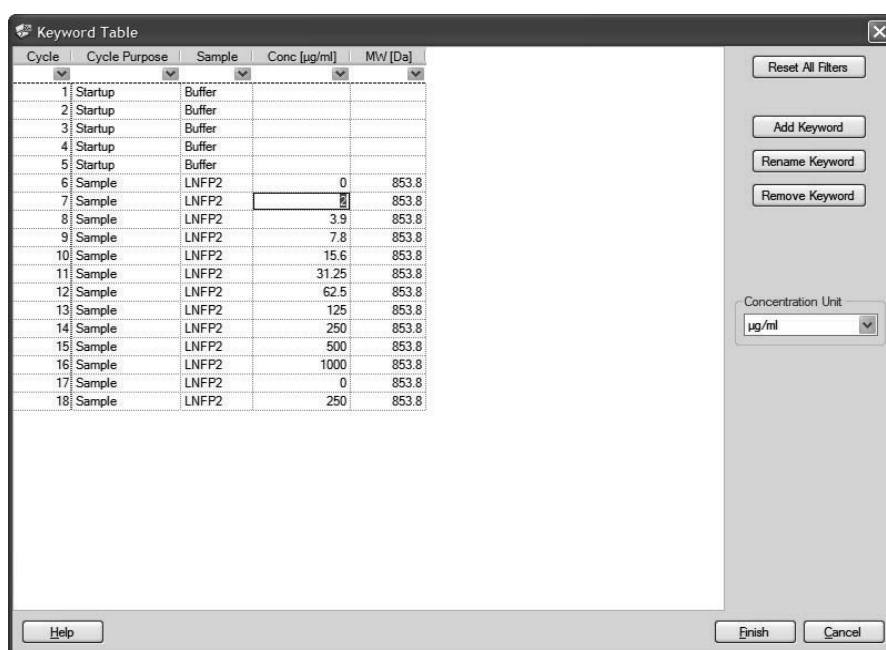
Biacore X100
You have aborted the run. Do you want to wash the system? (Recommended)
Yes　No

システムの洗浄を行う場合には、**Yes** をクリックします。洗浄後、停止します。

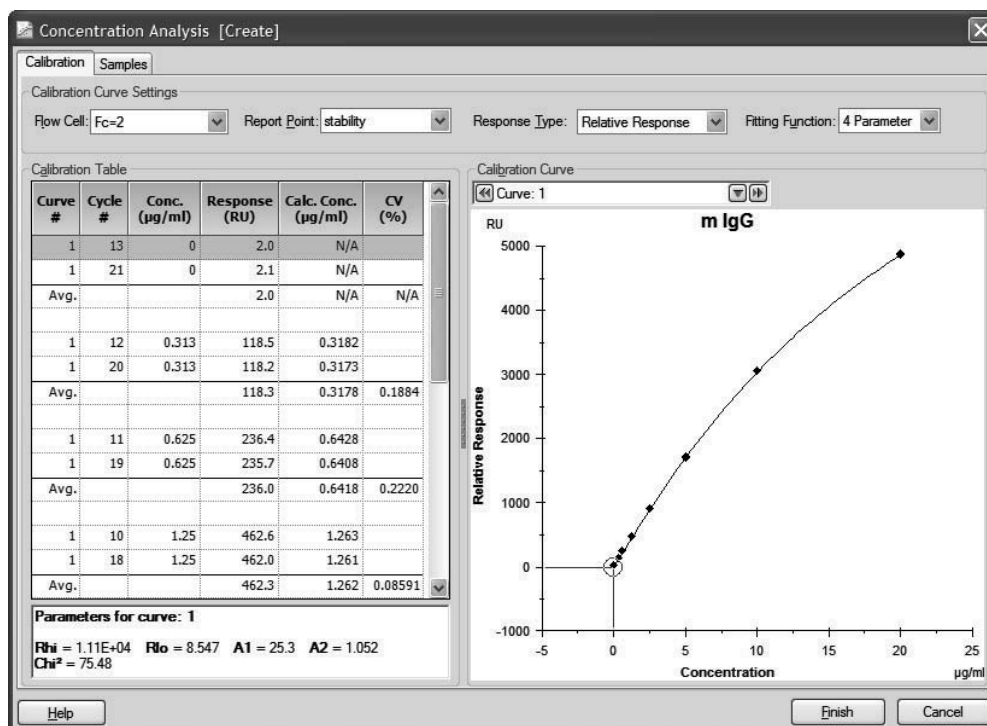
↓

測定が終了すると、システムは **Standby** 状態になります。取得データは自動保存され、解析に向け Biacore X100 Evaluation Software が立ち上がり、取得データが開きます。

Biacore X100 Evaluation Software のツールバーの Concentration Analysis をクリックします（アナライト情報などの入力ミスがあった場合は変更を行います。補足 6-2.を参照してください）。

補足 6-2. アナライト情報の変更

アナライト濃度、濃度単位、アナライト名などの入力ミスがあった場合は、**Keyword Table** から入力を変更します。**Tools...** → **Keyword Table...**をクリックします。

Cycle	Cycle Purpose	Sample	Conc [µg/ml]	MW [Da]
1	Startup	Buffer		
2	Startup	Buffer		
3	Startup	Buffer		
4	Startup	Buffer		
5	Startup	Buffer		
6	Sample	LNFP2	0	853.8
7	Sample	LNFP2	2	853.8
8	Sample	LNFP2	3.9	853.8
9	Sample	LNFP2	7.8	853.8
10	Sample	LNFP2	15.6	853.8
11	Sample	LNFP2	31.25	853.8
12	Sample	LNFP2	62.5	853.8
13	Sample	LNFP2	125	853.8
14	Sample	LNFP2	250	853.8
15	Sample	LNFP2	500	853.8
16	Sample	LNFP2	1000	853.8
17	Sample	LNFP2	0	853.8
18	Sample	LNFP2	250	853.8

目的のセルをクリックして、変更を行います。

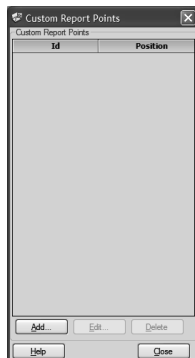
↓

Calibration Curve Settings・・・

Flow cell :	評価するフローセルを選択します。
Report Point :	評価するレポートポイントを選択します。初期設定では stability が選択されています。レポートポイントの追加を行う場合には補足 6-3.を参照してください。
Response Type :	濃度定量にレポートポイントのレスポンス（Relative Response）を採用するか、傾き（Slope）を採用するかを選択します。通常は、Relative Response を選択します。
Fitting Function :	検量線のフィッティング方法を選択します。“4-Parameter”または“Linear”を選択できます。通常、4-Parameter を選択します。

Calibration Table・・・

Curve #　:	検量線番号
Cycle# :	測定サイクル番号
Conc. :	入力した標準サンプルの濃度
Response(RU) :	結合量
Calc.Conc. :	検量線から算出された標準サンプルの濃度
CV(%) :	Calc.Conc.の変動係数（くり返し測定を行った場合のみ算出されます）

補足 6-3. レポートポイントの追加

Report Point の Stability は、アナライト添加終了の 20 秒後に設定されています。レポートポイントを追加したい場合には、ツールバー → **Custom Report Points...**をクリックします。

Add...をクリックします。

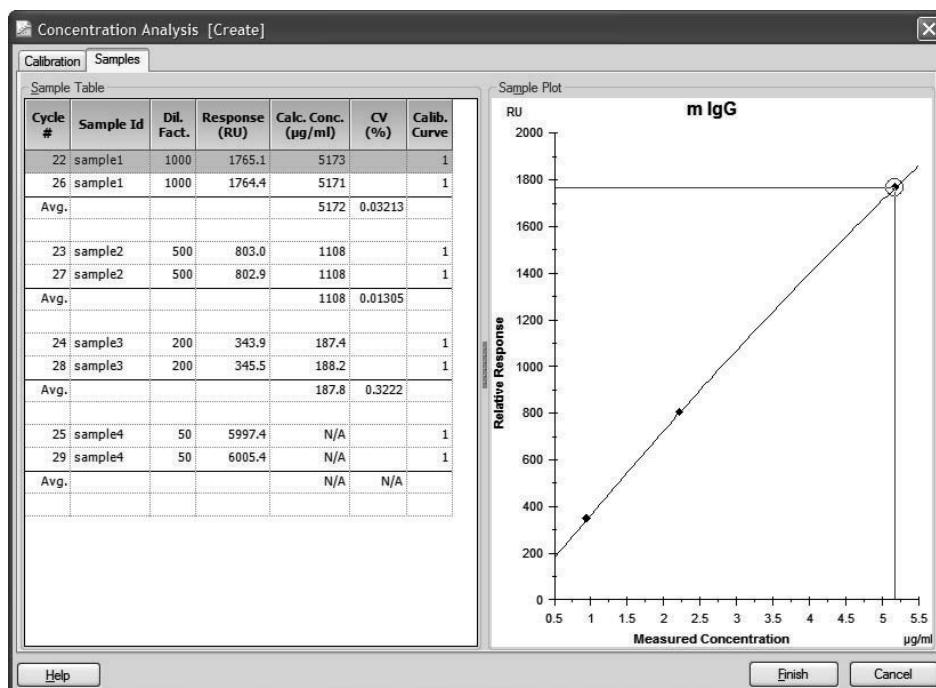
↓

Id：にレポートポイント名を入力し、追加したいレポートポイントの位置を設定します。**Cycles** で、レポートポイントを追加するセンサーグラムを指定します。

補足 6-4. 測定サイクルの削除

Calibration Table で削除したいサイクルのセルをクリックします。マウスの右クリックを押し、**Exclude Cycle** を選択します。選択したサイクルを除いて、再度フィッティングを行います。削除したサイクルを戻す場合は、マウスの右クリックを押して、**Import Cycle** をクリックします。

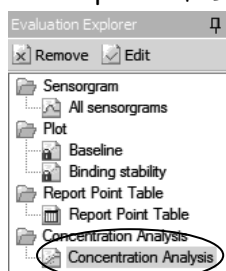
Samples タブをクリックします。

↓

Sample Table・・・

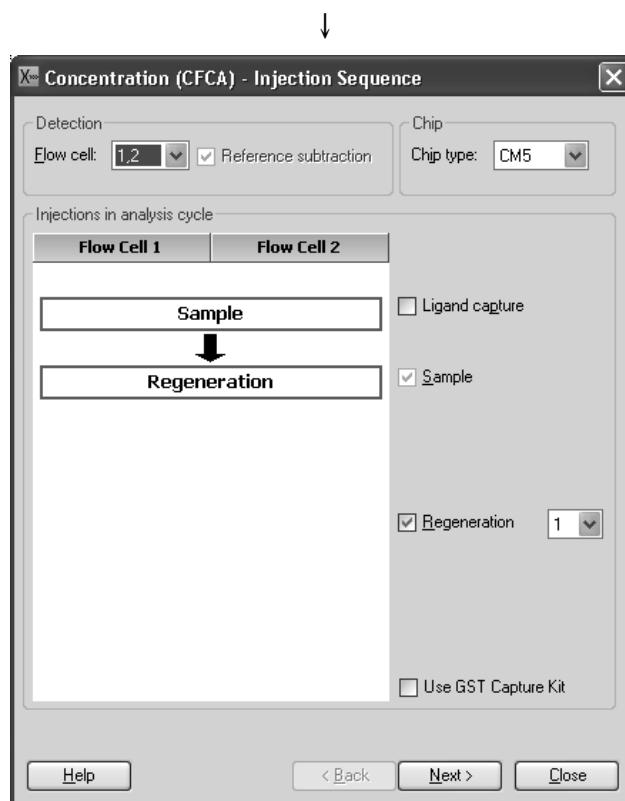
Cycle# :	測定サイクル番号
Sample id. :	アナライト（濃度未知サンプル）名
Dil. Fact. :	希釈倍率
Response(RU) :	結合量
Calc.Conc. :	算出された濃度 （検量線から外れている場合には、N/A と表示）
CV(%) :	Calc.Conc.の変動係数 （くり返し測定を行った場合のみ算出されます）
Calib. Curve. :	濃度計算に利用した検量線番号

Finish をクリックします。

↓

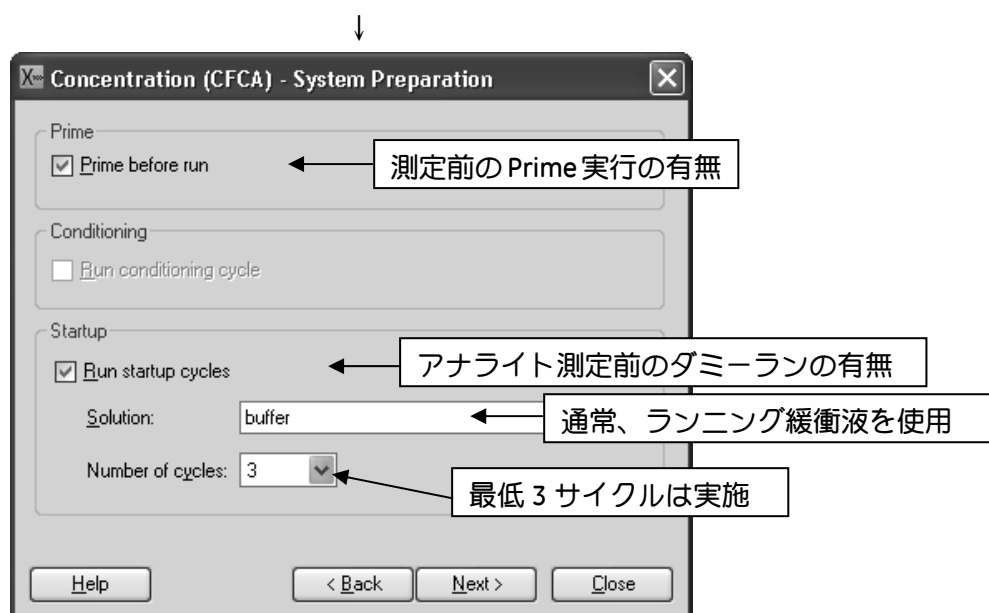
上記解析結果は、画面左端の Evaluation Explorer 中のフォルダに追加保存されます。

6-2. 検量線不要の濃度測定および解析

Other options → Wizards... → Concentration → Calibration Free (CFCA)をクリックします。

↓

Injection Sequence ダイアログが表示されます。各項目を設定し、Next>をクリックします。

↓

Next>をクリックします。

↓

Next>をクリックします。

↓

Concentration (CFCA) - Samples

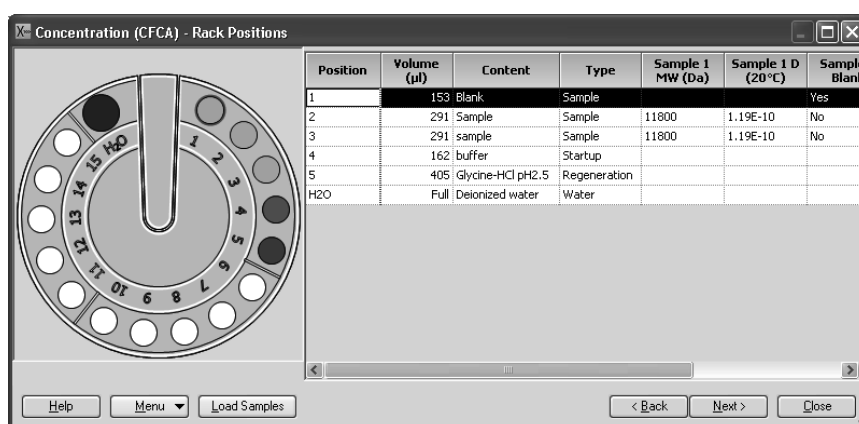
Sample table

Each row in in the sample table will generate two cycles with different flow rates.

	Sample id	Dilution factor	D (20°C)	MW (Da)	Blank
1	Blank				☑
2	Sample	100	1.19E-10	11800	☐
3	sample	500	1.19E-10	11800	☐
4	Sample	100	1.19E-10	11800	☐
5	sample	500	1.19E-10	11800	☐
6					☐

Help　　< Back　Next >　Close

アナライト名、希釈倍率、20℃ における拡散係数、分子量を入力します。Blank（0 濃度）として測定するサンプルは、Blank カラムにチェックを入れます。

Next>をクリックします。

↓

Rack Positions ダイアログが表示されます。テーブルにしたがいサンプルをラックにセットします。Next>をクリックします。

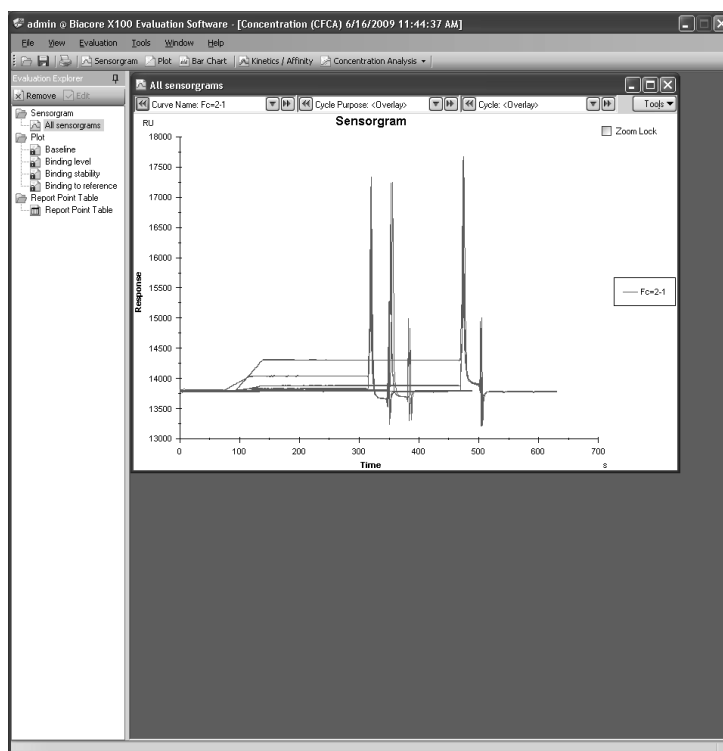
↓

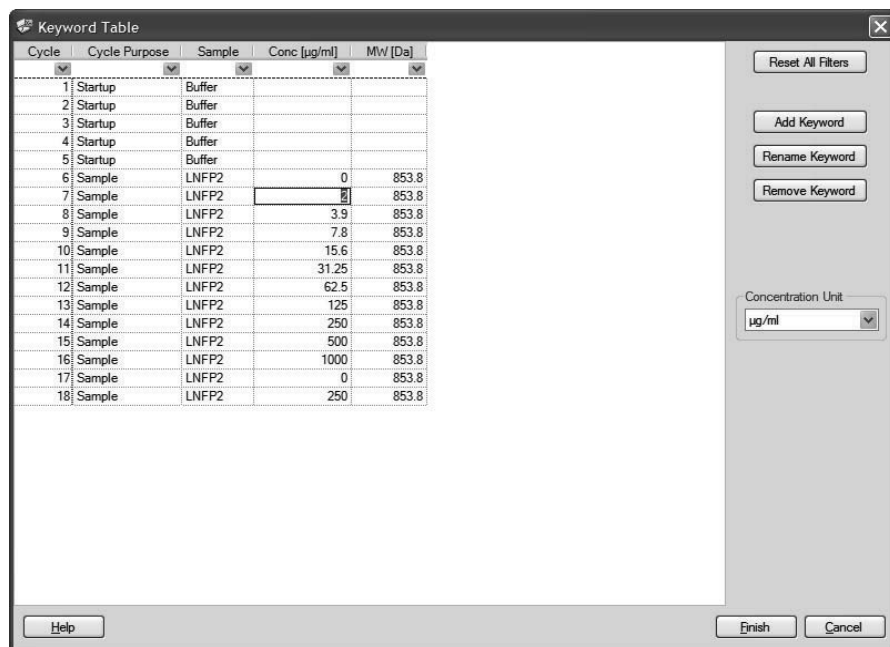
確認画面が表示されます。確認後、Start をクリックします。

↓

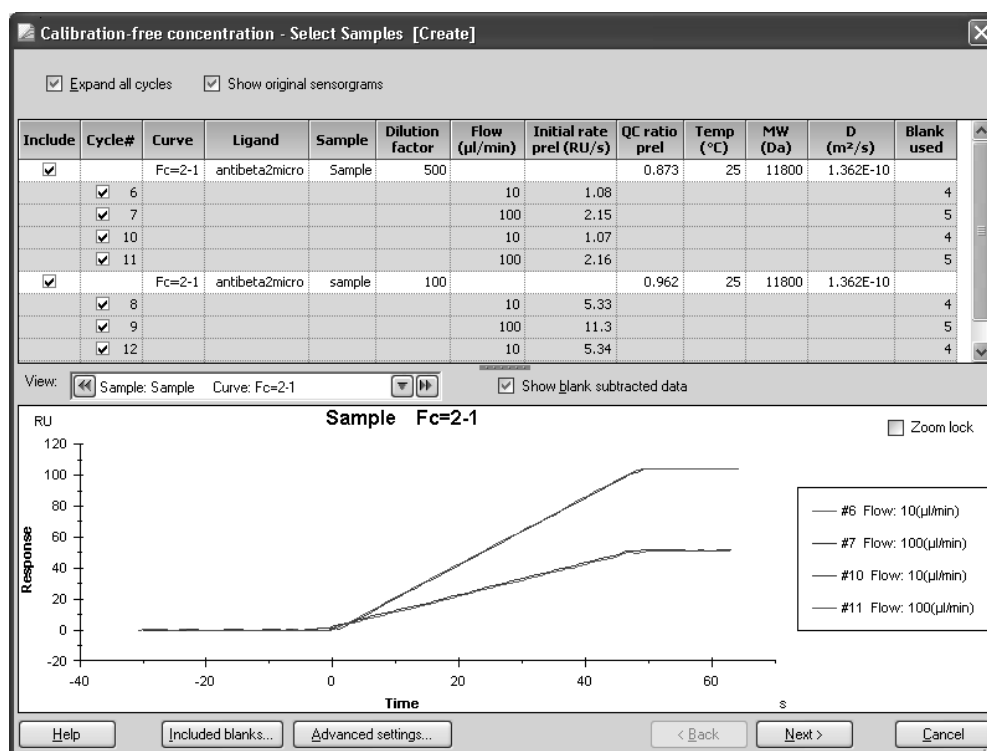
結果の保存先とファイル名を指定後、Save をクリックします。測定を中断する場合は、補足 6-1.（145 ページ）を参照してください。

↓

測定が終了すると、システムは Standby 状態になります。Standby の終了方法は、2-1-4.（22 ページ）を参照してください。取得データは自動保存され、解析に向け Biacore X100 Evaluation Software が立ち上がり、取得データが開きます。

補足 6-5. アナライト情報の変更

アナライト濃度、濃度単位、アナライト名などの入力ミスがある場合は、**Keyword Table** から入力を変更します。**Tools...** → **Keyword Table...**をクリックします。

目的のセルをクリックして、変更を行います。

↓

ツールバーの Concentration Analysis をクリックし、 Calibration-free を選択します。

画面上の表に、測定したサンプル情報が、測定サイクル順に表示されます。

Cycle#　測定サイクル番号

Curve　測定フローセル

Ligand　リガンド名

Sample　アナライト名

Dilution factor　希釈倍率

Flow (µl/min)　測定流速

Initial rate (RU/s)　添加開始 10 秒後の、5 秒幅における結合速度

QC ratio prel　QC 比

Temp (℃)　測定温度

MW (Da)　分子量

D (m²/s)　測定温度における拡散係数

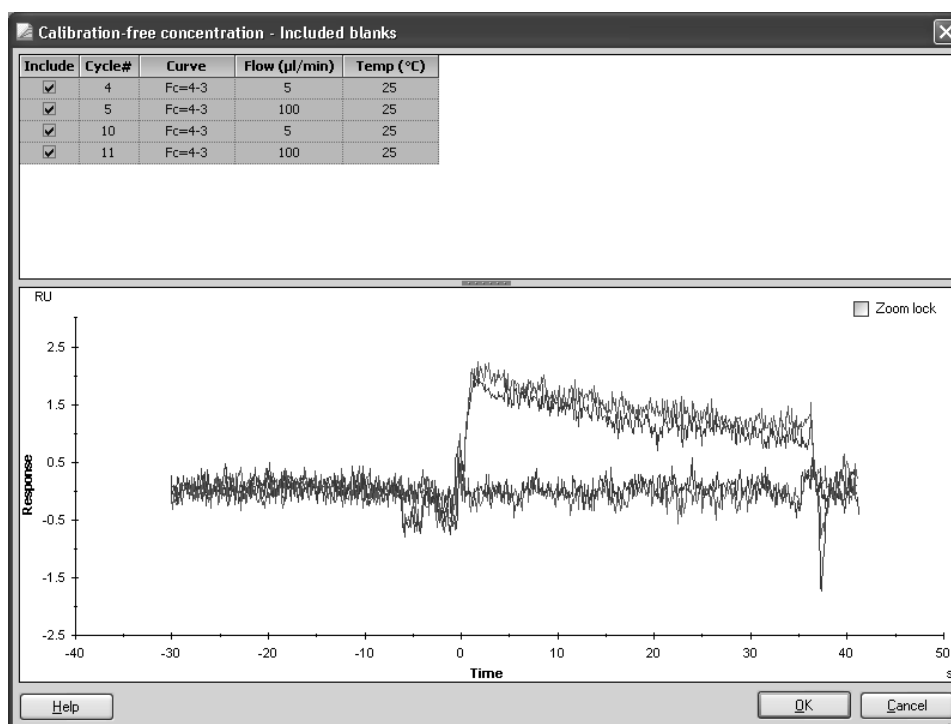
Blank used　ブランク（ランニング緩衝液をアナライトと同様に添加したもの）として利用しているセンサーグラムのサイクル番号

画面上部の **Expand all cycles** のチェックを外すと、サンプル情報表の表示がサンプル名別のリストに変更します。リファレンスセルを差し引かないセンサーグラムで解析を行う場合は、**Use reference subtraction data** のチェックを外します。

↓

画面左下の、Included blanks...をクリックして、ブランクの確認を行います。

Calibration-free concentration - Included blanks

Include	Cycle#	Curve	Flow (µl/min)	Temp (°C)
☑	4	Fc=4-3	5	25
☑	5	Fc=4-3	100	25
☑	10	Fc=4-3	5	25
☑	11	Fc=4-3	100	25

エアーの混入などの理由により形状が乱れているブランクは、画面上表の **Include** のチェックを外します。ブランクの差し引きを行わなくても解析は可能です。ブランクを利用しない場合は、**Include** のすべてのチェックを外します。
選択後、**OK** をクリックします。

↓

解析に利用できるセンサーグラムの選択を行います。評価基準は、補足 6-6.を参照してください。

補足 6-6. CFCA に利用するセンサーグラムの選択基準

CFCA では、マストランスポートリミテーション条件下のセンサーグラムを解析に利用します。以下の評価基準を満たすセンサーグラムを解析に利用します。

① **低流速の初期速度（Initial rate (RU / s) ）= 0.3～15 (RU / s)**

＜ 0.3 RU/s では、レスポンスの上昇量が低いため良好な結果が得られません。

＞ 15 RU/s では、マストランスポートリミテーションが十分ではない危険性があります。

② **QC ratio ≧ 0.13**

＜ 0.13 の場合には、マストランスポートリミテーションが十分ではありません。

解析に利用しないセンサーグラムは、Include のチェックを外します。
選択したセンサーグラムを確認する場合は、画面中央の

で選択します。▼をクリックしてセンサーグラムを選択します。Show blank subtracted data のチェックを外すと、リファレンスセルと差し引き前のセンサーグラムを確認できます。
Next >をクリックします。

↓

解析が開始します。

↓

Curve	Ligand	Sample	Dilution factor	Meas. Conc (M)	Calc. Conc (M)	QC ratio fit	Temp (°C)	MW (Da)	D (m²/s)	Chi² (RU²)	SE (Meas. Conc)	Cycles	Blank subtr.	Fit status
Fc=2-1	antibeta2micro	Sample	500	7.5E-09	**3.7E-06**	0.933	25	11800	1.362E-10	0.043	3.6E-11	6 - 7, 10 - 11	Yes	Completed
Fc=2-1	antibeta2micro	sample	100	3.8E-08	**3.8E-06**	0.961	25	11800	1.362E-10	0.068	4.1E-11	8 - 9, 12 - 13	Yes	Completed

解析が終了すると、画面上部に各サンプルの結果が表示されます。

Meas.Conc (M)	解析によって算出された濃度 （▼をクリックすると単位変更が可能）
Calc.Conc (M)	希釈倍率を Meas.Conc に掛けた濃度
QC ratio fit	QC 比
Chi² (RU²)	カイ二乗
SE (Meas.Conc)	Meas.Conc の標準誤差

解析結果の評価については、補足 6-7.を参照してください。

Finish をクリックします。

↓

上記解析結果が、Evaluation Explorer 中のフォルダに追加保存されます。

補足 6-7. CFCA の解析結果の評価

以下の基準を満たしている場合は、良好な結果と判断します。

① **カーブフィッティングが良好です**

フィッティングが良好な場合、カーブフィッティングによって得られた黒色のセンサーグラムが、測定センサーグラムと一致します。Chi² 値が、低流速のセンサーグラムの解離直前の結合量の 5% 以下であれば、フィッティングは良好と判断します。

② **SE (standard error) が解析結果濃度の 10% 以下です**

③ **解析結果濃度が、0.05～5 μg/ml の範囲内です**

範囲外の場合は、①、②の基準にパスしていても結果の取り扱いに注意が必要です。

補足 6-8. ファイル名の変更

Evaluation Explorer 中の目的ファイルをクリックします。

↓

Kinetics / Affinity
B2 u-globulin

上記状態で、キーボードの Backspace キーで、ファイル名を一度削除し、新たに新規ファイル名を入力します。

↓

Kinetics / Affinity
10C

7. メンテナンス

システム内部に設置されているマイクロ流路系は、**消耗品**であり、使用するサンプルの性状や使用頻度に応じて、耐久月数が異なります。**より長くマイクロ流路系を使用するために、システム使用毎のメンテナンスの実施を推奨します。**

システムのメンテナンスは既定のメンテナンスプログラム（メニューバーの **Tools** → **More Tools...** → **Maintenance Tools...**）を実行します。

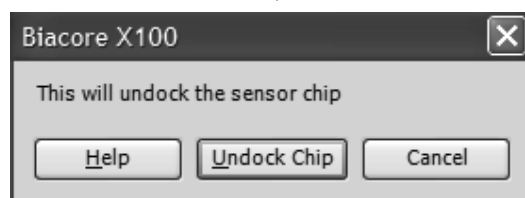
ランニング緩衝液として、超純水を使用します。また、メンテナンス時はメンテナンス用試薬によりセンサーチップ表面に固定化しているリガンドは変性するため、必ず Sensor Chip Maintenance（もしくは使用済みセンサーチップ）を使用します。
システム温度は 25℃ に設定します。

BIA maintenance Kit (BR-1006-66)
メンテナンスに必要な試薬が含まれています。
内容:

BIAdesorb solution 1	90 ml
BIAdesorb solution 2	90 ml
BIAtest solution	65 ml
BIAdisinfectant solution (conc.)	10 ml
BIAnormalizing solution	30 ml
Sensor Chip Maintenance	1 枚

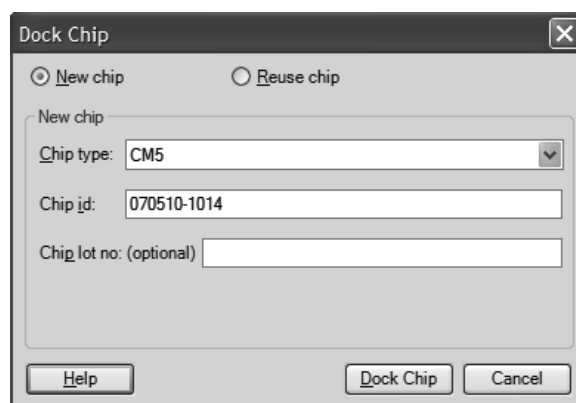
※　BIAdesorb solution1 は、購入後、常温保存。
※　その他のキット試薬は 4℃ 保存。

7-1. メンテナンスの準備

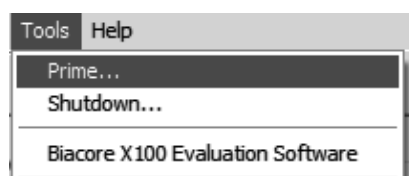
実験後、引き続きメンテナンスを実行する場合は、センサーチップの交換が必要です。
メニューバーの **Tools** → **Undock Chip...**またはツールバーのアイコン（ ）を選択します。

↓

Undock Chip をクリックします。

↓

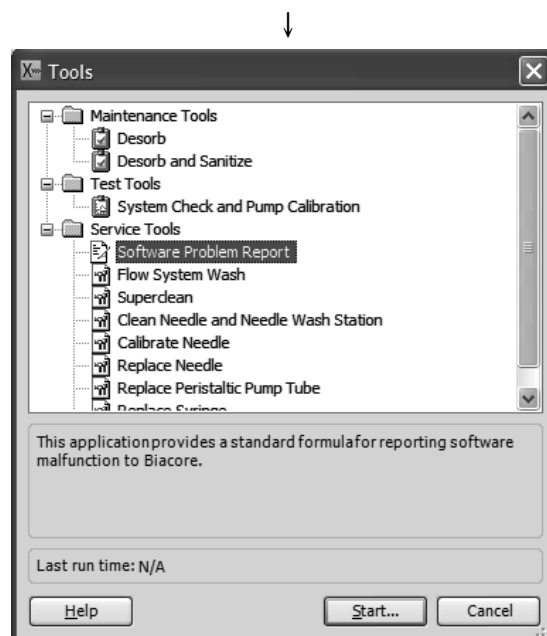
インジケーターの **Sensor chip** が点滅したら、扉を開けセンサーチップを取り出します。メンテナンス用センサーチップをセットします。合せて、ランニング緩衝液ボトルを超純水ボトルに交換します。

Chip type:に **Maintenance** を選択します。Dock Chip をクリックします。Dock が完了すると自動的に **Standby** 状態になります。

↓

メニューバーの **Tools** → **Prime...**を選択します。

Prime が終了すると、システムは **Standby** 状態になります。

7-2. メンテナンスの実行

メニューバーの **Tools** → **More Tools...**を選択します。

↓

Tools ダイアログが表示されます。

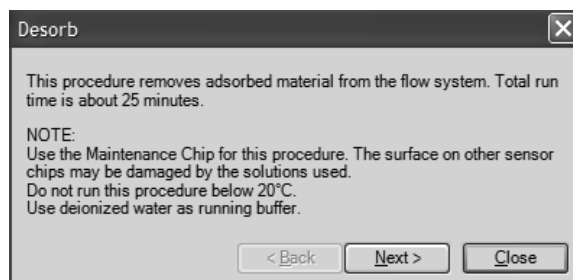
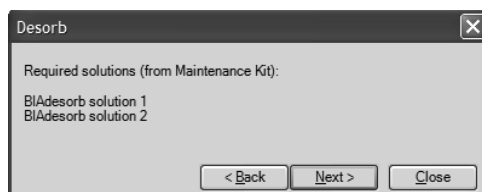
7-2-1. Desorb

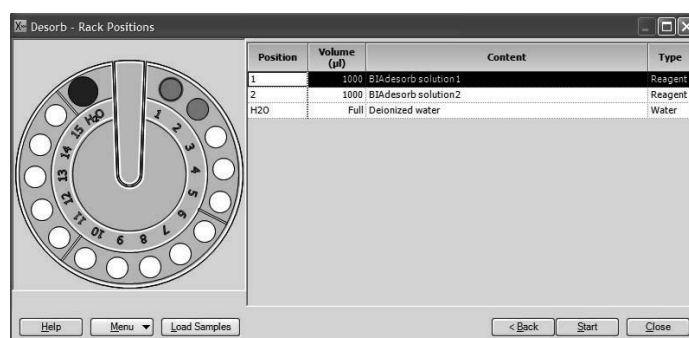
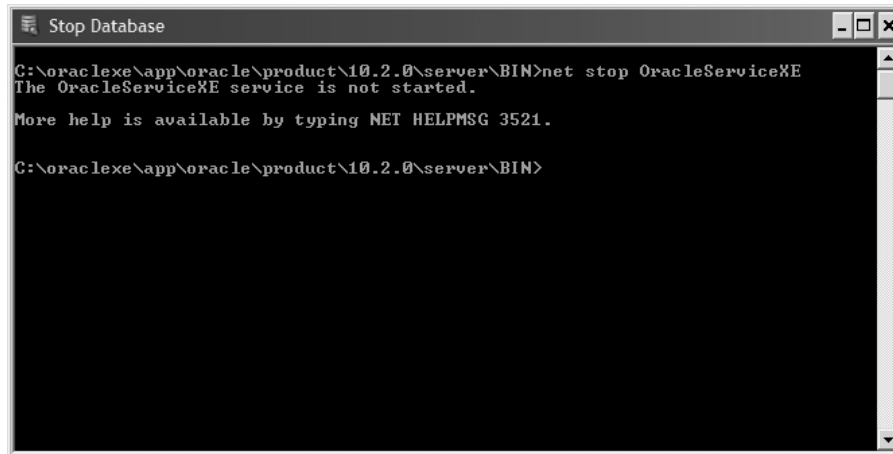
流路および、サンプルチューブに付着した汚れを洗浄する操作です。少なくとも、1 週間に 1 回は実施します。実験者が交代する場合にも実行します。所要時間は、約 25 分です。測定温度は、20℃ 以上で実施してください。

Tools→More Tools…→Maintenance Tools→ Desorb を選択して **Start…**をクリックします。

↓

内容を確認後、**Next>** をクリックします。

↓

内容を確認後、**Next>** をクリックします。

↓

BIAdesorb solution 1 および、BIAdesorb solution 2 を、それぞれ 1.5 ml プラスチックバイアルに 1000 µl 分注して指定のポジションにセットします。15 mm プラスチックバイアルに超純水を 4 ml 入れ、ポジション H2O にセットします。**Start** をクリックします。

Desorb が終了した後、システムは自動的に **Standby** 状態になります。**Standby** 状態で 3～4 時間放置します。**Close** をクリックし終了します。

7-2-2. Desorb and Sanitize

すべてのフローシステムの滅菌および、洗浄を行う操作です。少なくとも 1 ヶ月に 1 回は実施します。所要時間は、約 1 時間です。測定温度は、20℃ 以上で実施してください。

Tools→More Tools…→Maintenance Tools→Desorb and Sanitize を選択して **Start…**をクリックします。

↓

内容を確認後、**Next>** をクリックします。

↓

内容を確認後、**Next >**をクリックします。

↓

内容を確認後、**Next>** をクリックします。

↓

ステップ 1；

本体左側のランニング緩衝液用インレットチューブ 2 本を、BIAdesorb Solution 1 ボトル（10 ml）にセットします。**Start** をクリックします。所要時間 8 分程度です。

↓

ステップ 1 終了後、自動的にステップ 2 のダイアログが表示されます。

ステップ 2；

本体左側のランニング緩衝液用インレットチューブ 2 本を、BIAdesorb Solution 2 ボトル（10 ml）にセットします。**Start** をクリックします。所要時間 7 分程度です。

↓

ステップ 2 終了後、自動的にステップ 3 のダイアログが表示されます。

ステップ 3；

本体左側のランニング緩衝液用インレットチューブ 2 本を、希釈した BIAdisinfectant Solution（原液 1.5 ml＋超純水 20 ml）ボトルにセットします。**Start** をクリックします。所要時間 23 分程度です。

↓

ステップ 3 終了後、自動的にステップ 4 のダイアログが表示されます。

ステップ 4；

本体左側のランニング緩衝液用インレットチューブ 2 本を、超純水ボトルにセットします。**Start** をクリックします。所要時間 13 分程度です。

↓

ステップ 4 終了後、システムは自動的に **Standby** 状態になります。**Standby** 状態で 3～4 時間放置するか、**Prime** を 3 回実施します。**Close** をクリックし終了します。

7-2-3. Superclean

Superclean は、強力な洗浄効果を持つメンテナンスプログラムです。定期的なメンテナンスをしていても、システムの調子が思わしくない場合（システムチェックの結果が良好でない場合）に実行します。所要時間は、約 100 分間です。40-50℃ に温めた超純水をランニング緩衝液としてセットします。洗浄溶液は、BIA maintenance Kit に含まれていないため、用事調製します。Superclean 実施前に、Desorb and Sanitize の実行をおすすめします。

Tools→More Tools…→Service Tools → Superclean を選択して、**Start…**をクリックします。

↓

Next>をクリックします。

↓

Next>をクリックします。

↓

下記試薬を準備し、指定の場所にセットします。

1% 酢酸　；1,200 µL

0.2 M 重炭酸ナトリウム　；1,200 µL

6 M グアニジン塩酸（低分子化合物使用時は 50% DMSO）　；600 µL

10 mM 塩酸（低分子化合物使用時は 10% DMSO）　；600 µL

超純水；Full バイアル

Start をクリックしますと、実行開始となります。

Superclean 後は、試薬除去のため、**Standby** 状態で 3～4 時間放置するか、**Prime** を 3 回実施します。

7-3. システムチェックとポンプキャリブレーション

システムチェックおよびポンプキャリブレーションを行うプログラムです。このプログラムは Desorb and Sanitize による洗浄後に実行します。シグナルのドリフトや、エアースパイクの混入が激しい場合などに実施します。使用頻度が高い場合は、定期的に実行することをおすすめします。所要時間は、約 35 分です。

（準備品）

- BIAtest solution
- HBS-EP＋　10X (BR-1008-26)
- 新品の Sensor chip CM5

HBS-EP+をランニング緩衝液としてセットし、新品のセンサーチップ CM5 を **Dock** し、**Prime** を実行します。

メニューバーの **Tools** → **More Tools...**を選択します

↓

Test Tools → **System Check and Pump Calibration** を選択して **Start...**をクリックします。

↓

ランニング緩衝液は、HBS-EP＋（HBS-EP＋　10X を 10 倍希釈）をセットします。

Next> をクリックします。

↓

BIAtest Solution を、1.5 ml プラスチックバイアルに 123 µl 分注してポジション 1 にセットします。また、ポジション H2O に超純水を 4 ml セットし、**Start** をクリックします。

↓

続いて、測定結果の保存先を設定します。**Name:**にファイル名を入力して、**Save** をクリックすると、試験がスタートします。

↓

試験が終了すると、以下のシートが現れます。

測定値が正常値範囲内であれば“**Pass**”が表示されます。範囲外であれば“**Fail**”と表示されます。**Fail** が表示された場合は、弊社技術サービス部に連絡します。

8. シャットダウン

8-1. 実験の終了

実験が終了した際には、次の 2 つの方法のいずれかでシステムを維持します。

① **Standby** 状態での放置

② 電源を落として終了

7 日以内に使用する場合には、①の Standby 状態です。

7 日以上使用しない場合には、超純水で洗浄後、②の電源を落として終了します。

8-1-1. Standby 状態での放置

測定を終了すると自動的に **Standby** 状態になります。

セットしたランニング緩衝液で、最長 7 日間継続します。ランニング緩衝液は、7 日間で 200 ml 必要です。

ランニング緩衝液を涸らさないように注意します。廃液ボトルの空き容量にも注意します。

ステータスバー　；

Online - COM1	Temperature: 25.00 °C	Sensor chip: CM5
		Running standby, remaining time: 7.0 days

8-1-2. 電源を落として終了

メニューバーの **Tools** → **Undock Chip** またはツールバーのアイコン（ ）を選択します。

↓

Undock Chip をクリックします。

↓

インジケーターの **Sensor chip** が点滅したら、扉を開けセンサーチップを取り出します。

メンテナンス用センサーチップをセットします。合せて、ランニング緩衝液ボトルを超純水ボトルに交換します。

↓

Chip type:で Maintenance を選択し、**Dock Chip** をクリックします。

↓

メニューバーの **Tools** → **Prime...**を選択します。

↓

Prime 終了後、再びセンサーチップを Undock して、Biacore X100 control software を **Exit** します。

↓

モニター画面左下の **Start** をクリックして、**All Programs/ Oracle Database 10g Express Edition/ Stop Database** を実行します。

補足 8-1. Stop Database のコピー

スタートメニューの **All Programs/ Oracle Database 10g Express Edition/ Stop Database** アイコンをクリック＆ドラッグで右図の場所（スタートメニュー）にコピーできます。

ショートカットキーをデスクトップに作成しておくとわかりやすいです。

DOS ウィンドウが表示され、『Oracle Database の終了』がはじまり、数十秒後に「The OracleServiceXE service was stopped successfully.」と表示されます。その後、右上のクローズドボックスをクリックして DOS ウィンドウを閉じます。

↓

モニターの初期画面中の左下のスタートメニューから、Windows を **Shutdown** します。Biacore X100 本体電源を落とした後、システム前面のパネルを開け、ペリスターポンプのカバーを開けた状態にします。

（次回 PC 起動時には、自動的に Oracle Database が再スタートします。）

補足 8-2. Oracle Database バックアップ中の警告画面

Stop Database を実行した際、Oracle Database のバックアップ中は、Oracle Database が終了しているため、次の DOS ウィンドウが表示されます。

このウィンドウが表示された場合は、Oracle Database のバックアップが終了するまで待ち（約 6 分間）、再度 **Stop Database** を実行します。

8-2. センサーチップの保存

取り出したセンサーチップは、以下の方法で保存することができます。
保存中にリガンドの活性が低下することが多いので、再使用の際は、リガンドの活性を確認することです。

① ドライ状態での保存
取り出したセンサーチップにパラフィルムを巻いて 4℃ で保存します。

② ウェット状態での保存
取り出したセンサーチップのシート部分をカバーから抜き取り、シートだけを、容器（50 ml 容のふたつきプラスチック管など）に分注した HBS-EP+などの緩衝液に浸し、4℃ で保存します。

―シートの取り出しと保存―
センサーチップはカバーとシートから構成されています。

ピンセットを用いてシートを抜き出し、緩衝液に浸して保存します。

―シートからの緩衝液成分の除去―
再利用する際は、シートの水分を取り除いてからカバーに収めます。
シート金膜の窪んでいる面はリガンド固定化面で、平らな面は検出面です。

プラスチックの部分および検出面	キムワイプで拭き、超純水で湿らせたキムワイプで再度拭きます。さらに、乾いたキムワイプで拭き、水分を取り除きます。
固定化面	キムワイプを“こより状”に細くして、金膜の中央部分に触れないように､四隅から緩衝液を吸い取ります。

―カバーへの収納―
埃に注意しながらカバーに収めます。検出面が表になる向きで、ピンセットでカバーに挿入します。

9. センサーグラムの編集

ウィザードを用いた測定プログラム終了後、解析用ソフトウェアである Biacore X100 Evaluation Software は自動的に立ち上がり、取得データは編集・解析に向け開かれます。過去に取得したデータを編集解析する場合は、Biacore X100 Evaluation Software を起動し、ファイルの呼び出しから行います。

9-1. 解析用ソフトウェアの起動

Windows 画面左下の **Start** メニュー→ **Programs** または **All Programs** → **Biacore** → **Biacore X100 Evaluation Software** をクリックします。

9-2. ファイルの呼び出し

もしくは **File** → **Open…**をクリックし、目的ファイルを選択し **OK** をクリックします。

補足 9-1. 画面の説明

メニューバー・・・	すべての作業コマンドを含む各種メニュー表示
ツールバー・・・	使用頻度の高い作業コマンドをアイコン化して表示
Evaluation Explorer・・・	測定データ、解析後のデータの表示
Sensorgram	センサーグラムフォルダ
Plot	レポートポイント名別のプロットフォルダ
Baseline	サンプル添加直前の AbsResp
Binding level	サンプル添加時の Baseline からの RelResp
Binding stability	サンプル添加直後の Baseline からの RelResp
Binding to reference	リファレンスセルに対する Binding level
Report Point Table	レポートポイントのテーブルフォルダ
Work area・・・	Evaluation Explorer で選択したファイルを表示

9-3. センサーグラムの編集

Evaluation Explorer でSensorgram フォルダから、All sensorgrams をクリックし、Work area 内に Sensorgram window を表示します。

9-3-1. センサーグラムの表示

Sensorgram window 上部のセレクションツール

Curve Name: Fc=2-1　Cycle Purpose: <Overlay>　Cycle: <Overlay>

を使用します。

特定のフローセルからのセンサーグラムの選択

Curve Name: Fc=2-1 のもしくはをクリックし、目的のフローセルを選択します。

複数のフローセルを同時に表示する場合は、を使用します。

Curve Name	Curve Type
Fc=1	Reference
Fc=2	Active
Fc=2-1	ReferenceSubtracted

キーボードの[Ctrl]キーを押しながら、目的のフローセルをクリックします。連続したフローセルを選択する場合は、マウスのドラッグ操作によっても可能です。

特定のサイクルからのセンサーグラムの選択

Cycle: <Overlay> のまたはをクリックし、目的のサイクルを選択します。

↓

複数のサイクルを同時に選択する場合は、を使用します。

Included	Cycle#	Cycle Purpose	Sample Name	Conc.	MW
Yes	1	Startup	Buffer		
Yes	2	Startup	Buffer		
Yes	3	Startup	Buffer		
Yes	4	Sample	b2-micro low		
Yes	5	Sample	b2-micro high		
Yes	6	Sample	b2-micro low		
Yes	7	Sample	b2-micro high		

キーボードの[Ctrl]キーを押しながら、目的のサイクルをクリックします。連続したフローセルを選択する場合は、マウスのドラッグ操作によっても可能です。

9-3-2. センサーグラムの表示の変更

Sensorgram window 上部のセレクションツールの左端にある Tools を使用します。

色の表示の変更

Tools → **Color By** → **Sample** をクリックします。
サンプル名ごとに、自動的にセンサーグラムの色が変更され、表示されます。
その他、測定温度ごとやフローセルごとにも色を変更し表示することが可能です。

レポートポイントの表示

Tools → **Report Point** → **Id and Marker** をクリックします。

9-3-3. サンプル添加開始時間、ベースライン合せ

Sensorgram window 上部のセレクションツールの左端にある Tools を使用します。
Tools → **Sensorgram Adjustment…**をクリックします。

↓

X-Adjustment に Report point (time=0)をクリックし、▼で baseline を選択します。

Y-Adjustment も同様に、Report point (response=0)をクリックし、▼で baseline を選択します。
OK をクリックします。

9-3-4. センサーグラムの不必要部分の削除

削除する範囲をマウスの右ボタンをクリック＆ドラッグし選択します。

Sensorgram window 上でマウスの右ボタンをクリックします。

Cut をクリックします。

↓

9-4. グラフの編集

Sensorgram window 上でマウスの右ボタンをクリックして表示される作業コマンドを使用します。

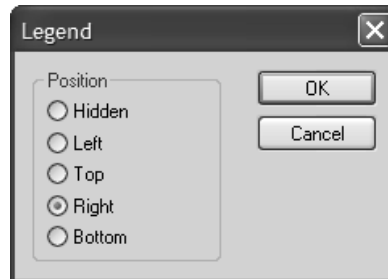
スケールの変更

Scale…

デフォルトで Auto が選択されています。スケールを変更する場合は、Autoのチェックを外し、各軸のスケールの最小値(Min:)と最大値(Max:)を入力します。

OK をクリックします。

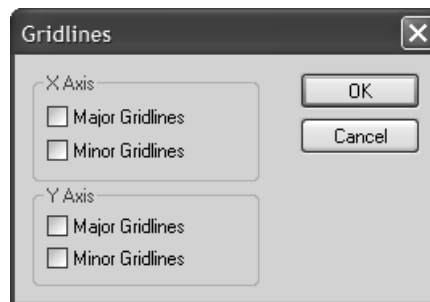
凡例の移動と削除

Legend…

デフォルトで Right が選択されています。凡例の位置はグラフの上下左右に配置することができます。移動する位置を選択し、OK をクリックします。

凡例を表示しない場合は、Hidden を選択します。

OK をクリックします。

マス目の表示

Gridlines…

大小 2 種類のマス目を入れることができます。

大きいマス目を表示するときは Major Gridlines、小さいマス目を表示するときは Minor Gridlines にチェックを入れます。

OK をクリックします。

9-5. グラフの貼りつけ

Sensorgram window 上で、マウスの右ボタンをクリックして表示される作業コマンドを使用します。

Copy Graph
グラフを画像としてコピーします。
Biacore 付属のパソコンにインストールされている Word Pad、Paint などに貼りつけ、貼りつけたファイルを保存します。保存したファイルは、画像として別のパソコンに移動させることが可能となります。

（例）Word Pad への貼りつけ

9-6. データの移管

センサーグラムの移管

Sensorgram window 上でマウスの右ボタンをクリックして表示される作業コマンドを使用します。

Export Curves...をクリックします。

↓

保存先を指定します。

すべてのセンサーグラムをテキスト形式で保存します（拡張子：txt)。保存したファイルは、ほかのパソコンの Microsoft Excel などのグラフ化ソフトウェアで再びセンサーグラムを作成することが可能です。

（例）保存した text ファイル

測定データの移管

測定結果を右クリックし、**Export → To other database...**を選択します。

ファイル名をつけて、目的の場所に保存します。

解析データの移管

File → Export → Result To Excel...

↓

保存先を指定します。

Evaluation Explorer に表示されている解析結果をテキスト形式保存します（拡張子：xls）。

ほかのパソコンの Microsoft Excel で解析結果を開くことができます。

（例）保存した xls ファイルを Microsoft Excel で開いた例

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	Evaluation	Kinetics / Affinity												
2	Name:	Sample												
3														
4	Sample:	Sample												
5	Temperatu	25												
6	Curve:	Fc=2-1												
7														
8	Model:	Bivalent Analyte												
9	Description:													
10														
11	Curve	ka1 (1/Ms)	kd1 (1/s)	ka2 (1/RUs	kd2 (1/s)	Rmax (RU)	Conc (M)	tc	Flow (ul/m	kt (RU/Ms)	RI (RU)	Chi² (RU²)	U-value	
12		28071.45	0.019845	0.000287	0.06355	15688.84		3764036				2643.192	N/A	
13	Cycle: 2						2.4E-09		30	11695736	2.114536			
14							1.2E-08				9.153725			
15							6E-08				58.73426			
16							3E-07				219.0913			
17							1.5E-06				274.0177			
18														
19														
20														

9-7. データの保存

解析およびセンサーグラムの編集後に、結果の保存を行います。

File →Save As…をクリックします。

保存先を選択し、**Name:**にファイル名を入力し、**Save** をクリックします。

10. ユーザー管理

10-1. ユーザー管理

ユーザー管理は、Biacore X100 Control Software を"**Administrators**"権限で立ち上げた場合のみ有効となります。
ユーザーグループは、"**Administrators**"（管理者）と"**Users**"（使用者）に分けられます。
初期設定では、1 名の Administrator が登録されています。

Username:　　admin
Password:　　administrator

Administrators グループ・・・	ユーザーアカウントの作成およびパスワードの設定、データのバックアップの設定変更ができます。データ（フォルダ）の削除には制限がありません。
Users グループ・・・	"Administrators"（管理者）が作成する"ユーザー名"のフォルダ（個人用）内にのみ測定データを保有できます。他ユーザーのデータ閲覧には制限がありません。ユーザー権限で作成したデータのみ削除可能です。管理者および他ユーザーが作成したデータの削除は不可能です。

メニューバーの **Tools** → **Preferences** で設定を行います。**Users** タブをクリックします。

パスワードの詳細設定を行う場合は、**Password Properties...**をクリックします。
次項目の設定が可能です。
・最小文字数
・変更の期間
・有効期限を督促する日数
（Add User ダイアログで、□Password never expires にチェックを入れた場合は、無効となります）

新規にユーザーアカウントを作成する場合は、**Add...**をクリックします。

↓

User name:　ユーザーネーム（必須）

Full name:　ユーザーのフルネーム（必須）

Group:　プルダウンメニューで、"Administrators"または、"Users"の選択を行います。

Description:　コメントがあれば入力

User password・・・

Password:　パスワード（必須）

※　必要に応じて、下記にチェックを入れます。

□**User cannot change password**

ユーザーによるパスワードの変更を無効にします。

□**Password never expires**

パスワードに有効期限を設けません。

（常に、チェックを入れ無期限の設定を行うことをおすすめします）

□**User must change password at next login**

ユーザーが初回ログインした際にパスワードの変更を行います（パスワードの管理は、ユーザーが行います）。

User account・・・

□**Account is locked**

アカウントを固定します（チェックを入れないことをおすすめします）。

□**Account is disabled**

アカウントを無効にします（フォルダは存在します）。

設定終了後、**OK** をクリックします。

10-2. データバックアップの設定

Biacore X100 Control ソフトウェアおよび Biacore X100 Evaluation ソフトウェアで保存したデータは、すべて"**Oracle Database 10g Express Edition**"のサーバー内に保存されます。
初期設定では、毎週日曜日 23 時から自動バックアップされます。"**Administrators**"（管理者）のみ、設定の変更が可能です。バックアップ中には測定を行わないことをおすすめします。
※　ハードディスクの空き容量として約 2 GB が必要となります。
Biacore X100 Control Software のメニューバーの **Tools** → **Preferences** の **Database Backup** タブをクリックします。

↓

Schedule・・・

曜日を指定

Start time:　開始時間を指定

Backup location・・・

Backup folder:　バックアップ先を指定
（初期状態では、C:/ProgramFiles/Biacore/BiacoreX100 Database/が設定されています）

☐**Enable second copy**

別途、ネットワークドライブなどへバックアップが可能

Number of saved backups:

バックアップの最大数を指定（デフォルトは 7）
※　バックアップ数が指定した数に達している場合、新たにバックアップを行うと古いバックアップが削除されます。

※
測定中にバックアップが実行された場合、測定データは C:ドライブに一時保存されます。保存されたデータをデータベースにインポートするために、測定終了後、ソフトウェアの再起動を行います。インポートするための確認画面が表示されます。画面にしたがいインポートを行います。

Restore・・・

指定したバックアップデータの修復が可能です。測定中に実施しないことをおすすめします。
プルダウンメニューからバックアップを選択して、Restore をクリックします。確認画面の OK をクリックすると開始します。

※
修復を実行すると、全データはバックアップデータに置換します。
修復中は、データベースにアクセスできません。
最終バックアップ以降に保存したデータおよびユーザーネームとパスワードは、次回修復時に削除されます。必要に応じ、データは C:ドライブに保存を行います。
測定中に修復を実行した場合、測定中のデータは C:ドライブに一時保存されます。測定終了後、データベースにインポートします。画面にしたがいインポートを実施します。

補足 10-1. データの保存先

各"Users"は、1 階層のみフォルダを作成できます。実験別にフォルダを作成することをおすすめします。

索引

K

L

M

N

O

P

Q

R

S

お

か

き

く

け

こ

さ

し

す

安全上のご注意

必ずお守りください

このしおりには、弊社機器に関する一般的な注意事項を記載しています。取扱いの詳細は必ず製品添付の使用説明書をご覧ください。

誤った取扱いをした場合に生じる危険や損害の程度を、次の区分で説明しています。

警告　誤った取扱いをした場合に、死亡や重傷を負う可能性があるもの。

注意　誤った取扱いをした場合に、傷害または物的損害が発生する可能性があるもの。

図記号の意味は次の通りです。

禁　止

🚫は、してはいけない「禁止」を示します。

❗は、必ず実行していただく「強制」を示します。

警告

禁　止

電源プラグの抜き差しにより、運転を停止しない

火災・感電の原因になります。

禁　止

電源コードを途中で接続しない、タコ足配線をしない

火災・感電・故障の原因になります。

禁　止

電源コード・電源プラグを傷つけない

●加工しない　●束ねない　●ねじらない
●折らない　●物をのせない　●加熱しない
●無理に曲げない

破損して火災・感電の原因になります。

禁　止

修理・分解・改造はしない

火災・感電の原因になります。

根元まで差込む

電源プラグのほこりを取り除き、刃の根元まで確実に差込む

接続が不十分だと、隙間にほこりが付着して火災・感電の原因になります。

指定の規格

取扱説明書に指定された規格のコンセントを使用する

指定された規格以外で使用すると火災・感電の原因になります。

禁　止

本体を水につけたり、水をかけたりしない

ショート・感電の原因になります。

禁　止

電源コードや電源プラグが傷んだり、コンセントの差し込みがゆるいときは使わない

感電・ショート・発火の原因になります。

禁　止

使用時や使用直後（運転停止後約60分間）は、操作に関係のない部位には触れない

高温部に触れ、やけどの原因になります。

プラグを抜く

異常時は、運転を停止して電源プラグを抜く

異常のまま運転を続けると火災・感電の原因になります。

禁　止

同梱の電源コード・電源プラグ以外のコード・プラグを使用しない

故障・火災・感電の原因になります。

禁　止

同梱の電源コード・電源プラグを他の電気機器に使用しない

故障・火災・感電の原因になります。

注意

禁　止

設置時は、次のような場所には置かない

●不安定な場所　●湿気やほこりの多い場所
●油煙や湯気が当たる場所
●直射日光の当たる場所　●風雨のあたる場所
●熱器具の近く　●高温になる場所
●吸・排気口をふさぐような場所

このような場所に置くと、ショートや発熱、電源コードの被膜が溶けるなどして、火災や感電、故障、変形の原因になることがあります。

禁　止

ぬれた手で電源プラグを抜き差ししない

感電の原因になります。

水平

水平で丈夫な場所に設置する

プラグを持つ

電源プラグを持ってまっすぐ引き抜く

ななめに引き抜いたり、コードを持って抜くと、プラグの刃や芯線が破損してショート・感電・発火の原因になります。

低温室で使用する場合の注意

電源を入れておく

装置を低温環境下でご使用になる場合、システム電源は常時入れておく

低温環境下で長時間システムの電源を落とした状態で放置すると、結露などにより故障の原因になります。
ランプなどの消耗品は OFF にしておくと、劣化を防ぐことができます。

電源を入れない

装置を低温室から常温の場所に移動させる場合、常温に設置後、装置内の結露が無くなるまでシステム電源を入れない（状況により異なるが、通常半日から一昼夜）

感電・漏電火災の原因になります。

弊社製品についてのお問合せ　（バイオダイレクトライン）

TEL : 03-5331-9336

受付時間　9 : 00 〜 17 : 30
土・日・祝日、弊社指定休業日、年末年始を除く

■機器メンテナンス・保守契約・修理のお問合せ

● **東日本技術サービス部**

TEL：03-5331-9315

FAX：03-5331-9349

● **西日本技術サービス部**

TEL：06-6305-4707

FAX：06-6305-3599

■テクニカルのお問合せ（バイオダイレクトライン）

● **TEL：03-5331-9336**

応答メッセージが聞こえましたら、下記の番号を押してください。

クロマトグラフィー関連製品　：❶
ビアコア関連製品　：❷
イメージャー・電気泳動関連製品　：❸
その他製品　：❹

● **FAX：03-5331-9370**

● **e-mail：Tech-JP@ge.com**

www.gelifesciences.co.jp

e-mail で最新情報をお届けしています。お申込みは上記 Web サイト右上の「メール会員登録」から

GEヘルスケア・ジャパン株式会社
ライフサイエンス統括本部
〒169-0073
東京都新宿区百人町 3-25-1 サンケンビルヂング
お問合せ：バイオダイレクトライン
TEL : 03-5331-9336　FAX : 03-5331-9370
e-mail : Tech-JP@ge.com

ISO 9001:2000認証取得

取扱店

10.02.2 (EP)